

**Masterarbeit**

**ETABLIERUNG DER WALDO-METHODE UND  
DESSEN ANWENDUNG ALS SURROGAT FÜR DIE  
MUTATIONSLAST ALS PRÄDIKTIVER MARKER FÜR  
IMMUNTHERAPIE**

eingereicht von

**Balkic Nejra, B.Sc.**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science (M.Sc.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Diagnostik und Forschungsinstitut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof.in Priv.-Doz.in Mag.a Dr.in rer.nat. Ellen Heitzer**

Graz, 15.06.2020

## Eidesstattliche Erklärung

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Masterarbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt und motiviert haben.

Der größte Dank geht an Assoz. Prof.in Priv.-Doz.in Mag.a Dr.in rer.nat. Ellen Heitzer, die meine Masterarbeit betreut und begutachtet hat. Sie ist eine Inspiration für junge Forscher und es war eine Freude und eine Ehre, Sie als Mentorin zu haben. Für die großartige Betreuung bedanke ich mich auch bei M.Sc. Weber Sabrina. Für die bioinformatische Auswertung möchte ich großen Dank Herrn Dipl.-Ing. BSc Benjamin Spiegl abstaten.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Leitung von ULG bedanken, da sie uns ermöglicht haben Medizinische Genetik in Graz zu studieren.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir immer hilfreich zur Seite standen. Weiterhin danke ich meinen Geschwistern und meinem Freund für den starken emotionalen Rückhalt und ständige Ermunterung.

## Inhalt

Eidesstattliche Erklärung .....	2
Danksagungen .....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	7
Abstract .....	9
1. Einleitung .....	10
1.1. Lungenkrebs .....	10
1.2. Diagnose.....	11
1.3. Behandlung von Lungenkrebs .....	13
1.3.1. Zielgerichtete Therapie.....	15
1.3.2. Immuntherapie .....	17
1.3.3. Liquid Biopsy .....	19
1.3.4. Zirkulierende freie DNA (cfDNA) .....	20
1.3.5. Methoden zur ctDNA-Analyse .....	22
2. Zielsetzung.....	27
3. Material und Methoden.....	28
3.1. Patienten und Kontrollmaterialien .....	28
3.2. DNA-Isolierung .....	29
3.3. Bestimmung der DNA-Konzentration .....	29
3.4. Etablierung des WALDO Protokolls .....	29
3.4.1. Protokoll .....	30
3.5. Bioinformatische Verarbeitung von Daten.....	32
3.6. Vergleich von WALDO mit mFAST-SeqS und plasma-Seq .....	33
3.7. Sequenzierung.....	34

3.7.1. Protokoll .....	34
4. Ergebnisse .....	34
4.1. Etablierung der Methode.....	34
4.2. Vergleich von WALDO und mFAST-SeqS .....	37
4.3. Vergleich von WALDO und plasma-Seq .....	38
4.4. WALDO-basierte Analyse von <i>LINE-1</i> Varianten .....	39
5. Diskussion.....	47
5.1. Conclusio .....	51
Literatur .....	53

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Methoden zur ctDNA Analyse. _____	23
Abbildung 2: Übersicht von Bioanalyzer-Profilen der WALDO-Library Preparation unter Verwendung verschiedener Mengen an DNA-Input und zwei Primersätzen. _____	35
Abbildung 3: Übersicht von Bioanalyzer-Profilen der WALDO-Library preparation von pDNA der Prostatakrebspatienten. _____	36
Abbildung 4: Übersicht von Bioanalyzer-Profilen der WALDO-Library Preparation von gDNA der Prostatakrebspatienten. _____	36
Abbildung 5: Vergleich von WALDO und mFAST-Seqs im Hinblick auf Chromosomenarm-spezifische Kopienzahlveränderungen. _____	37
Abbildung 6: Korrelation von WALDO-genomweiten Kopienzahlprofilen mit Plasma-Seq Profilen von zwei Prostatakrebspatienten. _____	38
Abbildung 7: Heatmap von WALDO-Plasmaproben von Patientinnen mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs mit verschiedenen genomweiten Z-Scores. _____	41
Abbildung 8: Korrelation zwischen VAF und Z-Score. _____	42
Abbildung 9: Korrelation zwischen Z-Score und dem Ansprechen auf Immuntherapie. _____	42
Abbildung 10: Korrelation zwischen Z-Score und dem Ansprechen auf Immuntherapie. _____	43
Abbildung 11: Violin-Plot von Anzahl an Mutationen in LINE-Sequenzen im Plasma-DNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten. _____	44
Abbildung 12: Violin-Plot von Anzahl an Mutationen in LINE-Sequenzen im Plasma-DNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten. _____	44
Abbildung 13: Violin-Plot von Indels in Homopolymerregionen in LINE-Sequenzen in pDNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten. _____	45
Abbildung 14: Violin-Plot von Indels in Homopolymerregionen in LINE-Sequenzen in pDNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten. _____	45
Abbildung 15: Amplikon Länge gemessen zwischen den inneren Primerenden (exklusive 35 Primerbasen). ____	46

## Zusammenfassung

Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom ist weltweit die häufigste krebsbedingte Todesursache. Als eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit schlagen viele klinische Studien die Immuntherapie vor. Bisher wurde die Verwendung von vier verschiedenen sog. Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab und Durvalumab) für die klinische Anwendung zugelassen. Die Ansprechraten für ICI liegen jedoch nur zwischen 20% und 25% (2, 3), was bedeutet, dass die meisten Patienten nicht davon profitieren, sondern mit schädlichen Nebenwirkungen der Therapie konfrontiert sind.

Ergebnisse einiger klinischer Studien schlagen vor, dass der TMB-Marker (engl. tumor mutational burden - Belastung durch Tumormutationen) ein vielversprechender prädiktiver Marker für ein Ansprechen auf Immuntherapie sein könnte. Tumorzellen mit hohem TMB weisen möglicherweise mehr Neoantigene auf, was zu einem Anstieg der T-Zellen zur Krebsbekämpfung in der Tumormikroumgebung und -peripherie führt. Diese Neoantigene können von T-Zellen erkannt werden, was eine Antitumorreaktion hervorruft. Jedoch ist die TMB-Bestimmung sehr kosten- und zeitintensiv, da die Sequenzierung des gesamten Exoms oder zumindest einer Megabase erforderlich ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Mutationen in *LINE-1* Sequenzen, die in unzähligen Kopien im Genom vorliegen, als Surrogatmarker für TMB und somit als prädiktiver Marker für ICIs herangezogen werden können. Dazu sollte sog. WALDO-Methode (engl. Within-Sample AneupLoidy DetectiOn", Aneuploidie-Erkennung innerhalb einer Stichprobe) herangezogen werden. Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung der FAST-SeqS-Methode dar, bei der mittels eines einzigen Primerpaares zigtausende *LINE-1* Sequenzen amplifiziert und mittels Next Generation Sequencing sequenziert werden. Durch die Verwendung von molekularen Barcodes (UMI, Unique Molecular Identifiers) in Kombination mit korrespondierender, konstitutioneller DNA, sind tumorspezifische *LINE-1* Mutationen erkennbar was wiederum die Abschätzung der somatischen Mutationen, Auswertung von karzinogenen Signaturen und Erkennung von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ermöglicht.

Unsere präliminiere Daten weisen darauf hin, dass die Patienten, die initial einen höheren Tumorgehalt hatten bzw. eine hohe Anzahl an Mutationen in *LINE-1*-Sequenzen aufwiesen, eher auf eine Immuntherapie ansprechen. Daher kann die Anzahl an Mutationen, die mittels WALDO bestimmt wird, als Surrogatmarker für TMB verwendet werden.

## Abstract

Non-small cell lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. Many clinical studies suggest immunotherapy as a promising treatment option. To date, the use of four different immune checkpoint inhibitors (ICI) (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab and durvalumab) has been approved for clinical use. However, the response rates for ICI are only between 20% and 25%, which means that most patients do not benefit from it but are instead faced with harmful side effects of the therapy.

Results from some clinical trials potentiate the use of TMB marker (Tumor Mutational Burden) as predictive marker of immunotherapy response. Tumor cells with a high TMB may have more neoantigens, which lead to an increase in T cells to fight cancer in the tumor microenvironment and periphery. These neoantigens are then recognized by T cells, causing an anti-tumor response. Nevertheless, determination of TMB requires sequencing of the entire exome or at least one megabase, which is time-consuming and expensive.

The aim of this thesis was to investigate whether mutations in *LINE-1* sequences, which are present in numerous copies in the genome, can be used as surrogate markers for TMB and thus as predictive markers for ICIs. To this end, the so-called WALDO method (Within-Sample AneupLoidy DetectiOn", aneuploidy detection within a sample) has been evaluated.

This method represents a further development of the FAST-SeqS method, in which thousands of *LINE-1* sequences are amplified using a single primer pair and sequenced using Next Generation Sequencing. By using molecular barcodes (UMI, Unique Molecular Identifiers) in combination with corresponding, constitutional DNA, tumor-specific *LINE-1* mutations are detectable, which in turn enables the estimation of somatic mutations, evaluation of carcinogenic signatures and detection of microsatellite instability (MSI).

Our preliminary data indicate that patients who initially had a higher tumor content or had a high number of mutations in *LINE-1* sequences were more likely to respond to immunotherapy. Therefore, the number of mutations determined by WALDO can be used as a surrogate marker for TMB.

## 1. Einleitung

Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2015 ist Krebs in 91 von 172 Ländern die erste oder zweithäufigste Todesursache vor dem siebzigsten Lebensjahr und in weiteren 22 Ländern die dritte oder vierte Todesursache. Krebsinzidenz und -mortalität nehmen aber weiter weltweit rasant zu. Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) erstellte 2018 einen Statusbericht zur weltweiten Krebsbelastung, der auf den Schätzungen von GLOBOCAN 2018 zur Krebsinzidenz und -sterblichkeit basierte (4).

### 1.1. Lungenkrebs

IARC zufolge ist Lungenkrebs die am häufigsten diagnostizierte Krebsart (11,6% aller Fälle) und die häufigste Krebstodesursache (18,4% aller Krebstodesfälle) bei beiden Geschlechtern (4). Lungentumore entstehen aus den Zellen des respiratorischen Epithels und können in zwei Kategorien unterteilt werden; kleinzellige (engl. small cell lung cancer, SCLC) und nicht-kleinzellige (engl. non-small cell lung cancer, NSCLC) Tumore. SCLCs sind hoch maligne Tumore aus Zellen mit neuroendokrinen Eigenschaften und machen 15% der Lungenkrebsfälle aus. NSCLCs betreffen 85% der Fälle und werden weiter in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome (engl. squamous cell cancer, SCC) und großzellige Karzinome aufgliedert (5).

Ein kritischer Schritt im Diagnoseverfahren und bei der Auswahl der optimalen Behandlungsmethode ist das Staging. Das Staging von NSCLC erfolgt mittels „TNM Staging System“, das von der internationalen Vereinigung zur Erforschung von Lungenkrebs (eng. International Association for the Study of Lung Cancer - IASLC) und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) genehmigt und im Januar 2017 überarbeitet und als 8. Ausgabe veröffentlicht wurde (6). TNM steht für „Tumour, Node, Metastasis“:

- T – Die Größe des Primärtumors, „Krebsfläche“,
- N – Ausbreitung des Krebses auf Lymphknoten,
- M – Ausbreitung des Krebses an anderen Körperteilen.

Den Stufen wird eine Zahl von 0 bis IV zugeordnet. Die Stufenzahl korreliert mit dem Krebs-Fortschritt; je niedriger die Stufenzahl, desto weniger fortgeschritten ist der Krebs und umgekehrt. Obwohl es auch für das Staging von SCLC angewendet werden kann, kommt es in der Praxis nur selten vor, viel öfters wird ein anderes System gebraucht, das nur zwei Stadien aufweist; ein begrenztes Stadium und ein ausgedehntes Stadium (6).

## 1.2. Diagnose

Wenn die Diagnose in früheren Stadien erfolgt, kann Lungenkrebs in 20% bis 40% der Fälle durch chirurgische Resektion geheilt werden (7). Allerdings werden die meisten Patienten erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und weisen aufgrund des Mangels an kurativen Therapien in diesen Stadien, ein sehr geringes Langzeitüberleben auf (8). Die Methode zur Diagnose von Lungenkrebs hängt von der Art (kleinzellig versus nicht-kleinzellig), der Größe und Lage des Primärtumors, dem Vorliegen von Metastasen und dem allgemeinen klinischen Status der Patienten ab (9).

Bildgebende Tests: Thorax-Radiographie ist meistens das erste bildgebende diagnostische Verfahren, das gemacht wird. Es hat sich aber erwiesen, dass CT (Computertomographie) etwas sensitiver für den Nachweis von Lungen-Knoten als konventionelle Thorax-Radiographie ist (10). Zunehmend werden in tägliche Praxis auch FDG-PET<sup>1</sup> (18-FluorDesoxyGlukose - Positronen Emissions-Tomographie), Knochenszintigraphie und Somatostatinrezeptorzintigraphie integriert, die ergänzenden Informationen liefern. Mit kombinierten PET-CT-Systemen, die neuerdings immer öfters benutzt werden, wird die Detektion metastasierter Erkrankungen verbessert, die Therapie kann besser gesteuert und klinische Ergebnisse vorhergesagt werden (12, 13).

Sputumzytologie: Sputumzytologie ist besonders nützlich bei Patienten mit zentral gelegenen Tumoren (z. B. SCLC oder Plattenepithelkarzinom) und bei Patienten mit Hämoptysen. Eine Sputumentnahme sollte der erste Schritt bei Patienten mit zentral

---

<sup>1</sup> Vor dem Scan erhält der Patient eine intravenöse (IV) Injektion einer radioaktiven Substanz, die als Tracer bezeichnet wird (18-Fluordesoxyglucose zum Beispiel). Der Tracer wird von Organen und anderen Körperteilen aufgenommen. Krebszellen, die eine höhere Stoffwechselrate aufweisen als gesunde Zellen, absorbieren mehr Tracer und sind daher auf den Bildern leicht zu erkennen (11).

gelegenen Läsionen sein sowie bei Patienten, bei denen ein semi-invasives Verfahren, wie Bronchoskopie, ein Komplikationsrisiko darstellen könnte (9). Sputum enthält exfolierte Atemwegsepithelzellen und unter dem Mikroskop ist es möglich, etwaige morphologische Anomalien der Bronchialepithelzellen nachzuweisen. Jedoch ist die Sensitivität dieser Methode sehr schlecht (14). Eine molekulare Untersuchung des Sputums ist vielversprechender, vor allem für die Diagnose von NSCLC. Es wurden viele Biomarker in Sputum beschrieben, wie beispielsweise lange nicht-codierende RNAs (lncRNA), mikro RNAs (miRNA), sowie Mutationen und aberrante Methylierungsmuster in bestimmten Genen (15–17). *Su Fang et al.* analysierten die Expression von drei miRNAs (miR-21, miR-31 und miR-210) und die Methylierung von drei Genen (*RASSF1A*, *PRDM14* und *3OST2*), die zuvor als potenzielle Biomarker für NSCLC identifiziert wurden. Das Panel mit drei miRNA-Biomarkern weist eine Sensitivität von 81,5% und eine Spezifität von 85,9% auf. Das Panel mit 3 Methylierungsbiomarkern zeigt eine Sensitivität von 82,9% und eine Spezifität von 76,4% für den NSCLC-Nachweis. Die integrierte Analyse von zwei miRNAs (miR-31 und miR-210) und 2 Genen (*RASSF1A* und *3OST2*) ergibt eine noch höhere Sensitivität (87,3%) und Spezifität (90,3%) im Vergleich zu den einzelnen Panels der Biomarker (17). Hiermit hat diese Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Integration von DNA-Methylierung und miRNA-Biomarkern einen effizienteren Ansatz für die Früherkennung von Lungenkrebs darstellen könnte.

Biopsie: Die Untersuchung von Gewebeproben, die durch invasive Biopsien entnommen werden, gilt als Goldstandard für die endgültige Diagnose, da sie eine immunhistochemische Untersuchung der Tumorzellen sowie die Erstellung von molekularen Profilen des Tumors ermöglicht. Eine Biopsie kann im Rahmen einer Bronchoskopie, einer Mediastinoskopie oder einer Nadelbiopsie durchgeführt werden. Die Bronchoskopie ist ein Verfahren, bei dem mithilfe eines Bronchoskops die Lunge sowie die Atemwege eines Patienten einschließlich der Stimmbox und des Stimmbandes, der Luftröhre und vieler Bronchienäste untersucht und Gewebe-Proben entnommen werden können (18). Grundsätzlich unterscheidet man die starre und die flexible Bronchoskopie. Bei der starren Bronchoskopie wird ein starres Bronchoskop, über dem die verschiedenen Optiken, Zangen und weiteren Werkzeuge eingeführt

werden können, in die Trachea des narkotisierten Patienten eingeführt. Mithilfe der Jet-Ventilation wird der Patient zugleich beatmet. Im Unterschied zur starren Bronchoskopie, besteht das flexible Bronchoskop aus einem biegsamen Material und die Patienten müssen nur sediert und nicht narkotisiert werden (19). Bei zentralen endobronchialen Läsionen liegt die Gesamtsensitivität von flexibler Bronchoskopie für die Diagnose von Lungenkrebs bei 88%. Die Sensitivität der Bronchoskopie nimmt bei peripheren Läsionen ab. Periphere Läsionen mit einem Durchmesser von weniger als 2 cm zeigten eine Empfindlichkeit von nur 34% bzw. 63% (9).

Der Goldstandard beim Verdacht auf Mediastinalmetastasen ist ein endoskopischer/endobronchialer Ultraschall (EUS/EBUS) in Kombination mit Mediastinoskopie (20). Bei der Mediastinoskopie handelt es sich um ein chirurgisch-diagnostisches Verfahren zur Bildgebung und Entnahme von Gewebeproben mit einer Sensitivität von ca. 78% (21).

Bei Patienten mit peripheren Läsionen oder bei denen eine flexible Bronchoskopie nicht möglich ist, werden normalerweise transthorakale Nadelbiopsien unter bildgebender Anleitung durchgeführt. Derzeit werden zwei transthorakale Biopsietechniken, die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) und die Kernnadelbiopsie (CNB), verwendet (22). Die beiden Techniken weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität zur Diagnose von Lungenkrebs als auch akzeptable Komplikationsraten auf (23, 24).

### 1.3. Behandlung von Lungenkrebs

Für die Behandlung von Lungenkrebs werden chirurgische Resektion, Bestrahlung, Chemotherapie, zielgerichtete (targeted) Therapie und Immuntherapie allein oder in Kombination eingesetzt, anhängig von der Art und Staging des Tumors.

Die meisten NSCLCs der Stadien I und II werden in kurativer Absicht operiert, um den Tumor zu entfernen. Aktuelle Studien besagen, dass eine adjuvante Chemotherapie nach der Operation bei Menschen mit NSCLC die Tumorrezidiv verhindern kann. Dies gilt insbesondere für Patienten mit Stadium II und IIIA. Bei Patienten mit Lungenkrebs im Stadium III, bei denen der Tumor nicht operativ entfernt werden kann, wird eine Chemotherapie in Kombination mit einer hochdosierten Bestrahlung empfohlen.

Die Hauptbehandlung für Patienten im Stadium IV ist jedenfalls die Chemotherapie. Der Chemotherapie-Behandlungsplan für Lungenkrebs besteht häufig aus einer Kombination von Medikamenten (25, 26). Zu den am häufigsten verwendeten Arzneimitteln gehören Cisplatin (Platinol) oder Carboplatin (Paraplatin) plus Docetaxel (Taxotere), Gemcitabin (Gemzar), Paclitaxel (Taxol und andere), Vinorelbin (Navelbine und andere) oder Pemetrexed (Alimta) (26). Laut *Scagliotti et al.* (27) empfiehlt sich Pemetrexed in Kombination mit einem Platin-Wirkstoff als Erstbehandlung bei nicht-squamösen histologischen NSCLC-Subtypen. Taxan mit einem Platin-Wirkstoff ist die bevorzugte Chemotherapie-Kombination für Plattenepithelkarzinome (28).

Als Erstbehandlung für alle Stadien des SCLC empfiehlt ESMO 4–6 Zyklen Cisplatin- oder Carboplatin-Doublet-Chemotherapie (29, 30). Thorax-Strahlentherapie kann gleichzeitig, bei fitteren Personen mit eingeschränktem Stadium (LD-SCLC), oder nacheinander, bei Personen, die auf die anfängliche Chemotherapie angesprochen haben, angewendet werden. Prophylaktische Schädelbestrahlung (PCI) ist im Allgemeinen Menschen vorbehalten, die auf eine Chemotherapie angesprochen haben (30). Obwohl diese Therapien seit 30 Jahren unverändert blieben, wurden in den letzten Jahren durch die zunehmende molekulare Charakterisierung von Tumoren, eine Reihe von zielgerichteten Therapien und Immuntherapien entwickelt.

In der Tumorphathogenese spielt der programmierte Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle. Wenn die Apoptosewege gestört werden, wird das Überleben der neoplastischen Zelle über die vorgesehene Lebensdauer ermöglicht. Die Notwendigkeit exogener Überlebensfaktoren wird verringert, und die Zelle wird vor oxidativem Stress und Hypoxie, während sich die Tumormasse ausdehnt, geschützt. Folglich kommt es zur Anhäufung genetischer Veränderungen, die die Zellproliferation deregulieren, die Differenzierung stören, die Angiogenese fördern und die Invasivität während des Tumorwachstums erhöhen (31).

Der technologische Fortschritt, im speziellen die Einführung von Next Generation Sequencing (NGS) hat das Verständnis der genetischen Landschaft von Tumoren erheblich verbessert und somit die Identifizierung vieler molekularer Pathways, die das Tumorwachstum antreiben, ermöglicht. Diese deregulierten Pathways können nun

mittels zielgerichteter Therapien und Immuntherapeutika therapeutisch angegriffen werden.

Einer dieser Pathways wird durch die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) getriggert. EGFR ist ein Transmembranglykoprotein, das aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Domäne mit der Tyrosinkinase-Region (TK), besteht. Tyrosinkinasen sind ubiquitär exprimierte Proteine, die an zahlreichen intrazellulären Signalwegen, einschließlich dem Zellwachstum, beteiligt sind. Liganden des EGFRs sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) sowie der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- $\alpha$ . Eine Bindung des Liganden löst die Dimerisierung des Rezeptors und somit die TK-Aktivität aus. Dies führt zu Autophosphorylierung des Rezeptors und Initiierung von Signalübertragungswege, die zur Zellproliferation, Hemmung der Apoptose und Angiogenese führen (32, 33).

Aberrante TK-Aktivität, erhöhte oder veränderte Expression von EGFR-TK oder seinen Liganden sind Kennzeichen vieler Tumoren, insbesondere NSCLC. Bei 40% bis 80% der NSCLC-Fälle tritt eine EGFR-Überexpression auf (34), wobei Plattenepithelkarzinome (84%), gefolgt von großzelligen (68%) und Adenokarzinomen am häufigsten betroffen sind (65%) (33, 35). Laut aktuellen Studien korreliert der Level an EGFR-Expression mit einer schlechten Krankheitsprognose und einer verringerten Überlebensrate (33, 35, 36).

Im Gegensatz zu zytotoxischer Chemotherapie, wirken Wirkstoffe, die auf den EGFR abzielen, aufgrund der begrenzten Rolle des EGFR in normalem nicht-embryonalem Gewebe selektiv auf maligne Zellen. Die EGFR-Signalübertragung kann auf zwei Weise gehemmt werden, einerseits durch die Verhinderung der Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne mit einem monoklonalen Antikörper, andererseits durch die Hemmung der intrazellulären TK-Aktivität (33).

### 1.3.1. Zielgerichtete Therapie

Zielgerichtete Therapien (engl. targeted therapies) richten sich gezielt gegen bestimmte biologische Merkmale eines Tumors, die das Wachstum der Tumorzelle

fördern. Dabei werden hauptsächlich Onkoproteine oder Onkogentargets blockiert, die durch Genfusionen, Mutationen oder Überexpression aktiviert wurden.

(37).

### TK-Inhibitoren

TK-Inhibitoren, die die TK-Phosphorylierung hemmen, sind kleine Moleküle, die beispielsweise mit der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle auf der intrazellulären Region des EGFR interferieren und somit Aktivität der Rezeptors unterbinden (38). Sie werden zur Erstbehandlung von fortgeschrittenem NSCLC und NSCLC mit Driver-Mutationen in *EGFR* eingesetzt. Ein gutes Ansprechen an die Behandlung mit EGFR-TKIs der ersten Generation wie Erlotinib und Gefitinib wurde bei Patienten mit *EGFR*-mutierten Tumoren beobachtet (37). Im Gegensatz zu EGFR-TKIs der ersten Generation, die reversible kompetitive ATP-Inhibitoren sind und nur auf EGFR abzielen, sind Inhibitoren der zweiten Generation, einschließlich Afatinib und Dacomitinib, irreversible Inhibitoren, die auch weitere epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren wie *HER2* und *HER4* blockieren. Sowohl Afatinib als auch Dacomitinib zeigten im Vergleich zu Gefitinib ein verbessertes progressionsfreies Überleben (PFS) (39). Osimertinib ist ein oraler irreversibler EGFR-TKI der dritten Generation, der selektiv sowohl sensibilisierende *EGFR*-Mutationen als auch erworbene Thr790Met (T790M)-Resistenzmutationen, die aufgrund des selektiven Drucks der Erstlinientherapie mit Erlotinib und Gefitinib entstehen, hemmt (40). Derzeit gibt es auch fünf von der FDA zugelassene Inhibitoren für *ALK*-Fusionen, darunter Crizotinib der ersten Generation, Ceritinib der zweiten Generation, Alectinib und Brigatinib sowie Lorlatinib der dritten Generation (41).

Bei SCLC finden sich vielfältigere und herausforderndere, vorwiegend Tumorsuppressor-gesteuerte Targets. Aurorakinaseinhibitoren stellen eine vielversprechende Klasse von Tyrosinkinaseinhibitoren dar, die bei SCLC eine gemischte Aktivität aufwiesen. Aurora-Kinasen (A-C) sind Serin/Threonin-Kinasen, die die Zentrosomenfunktion und die Chromosomenorientierung regulieren, die für eine angemessene und funktionelle Mitose erforderlich sind. Eine Störung dieser Prozesse verhindert die Zellteilung oder kann zu einer unangemessenen chromosomalen

Sortierung führen, gefolgt von einem Stillstand des Zellzyklus oder Apoptose (42, 43). Einige von diesen Inhibitoren, wie Aurorakinase A-Inhibitor Alisertib und Aurora Kinase B-Inhibitor Barasertib zeigten vielversprechende Ergebnisse in der SCLC-Behandlung (44).

### Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAbs), die zu groß sind, um in die Zellen einzudringen, werden typischerweise für Targets entwickelt, die sich außerhalb der Zellen befinden (72). Sie hemmen das Tumorwachstum durch Unterbrechung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden. In Beispiel von EGFR, konkurrieren mAbs mit TGF- $\alpha$ , EGF und anderen natürlichen Liganden um extrazelluläre EGFR-Bindungsstellen, wodurch die Autophosphorylierung der intrazellulären Region verhindert wird; infolgedessen bleibt die TK-Domäne inaktiv, und es tritt keine Signalübertragung auf, was zu einer Hemmung des Zellzyklus, zur Förderung der Apoptose und zur Antiangiogenese führt (73).

### 1.3.2. Immuntherapie

Antitumor-Immunantworten sind als Krebs-Immunzyklus bekannt, der die Freisetzung von Krebsantigenen, die Präsentation von Krebsantigenen über Antigen-präsentierende Zellen, den Transport von T-Zellen zu Tumoren, die Tumor-Infiltration durch T-Zellen, die Erkennung von Krebszellen durch T-Zellen und abschließend Abtötung von Krebszellen umfasst (45, 46). Um das empfindliche Gleichgewicht zwischen Immunaktivität und Autoimmunität aufrechtzuerhalten müssen zahlreiche Faktoren, die in jedem Schritt des Zyklus vorkommen, reguliert werden (47). Die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten wird unter normalen Umständen durch Immun-Checkpoint-Moleküle reguliert (48, 49). Die bislang am besten charakterisierten sind das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA4) und der programmierte (Zell)Tod (PD-1) Immun-Checkpoints (50).

Für die T-Zell-Aktivierung ist alleinige die Bindung von T-Zellrezeptoren (TCR) an Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) nicht ausreichend; es sind noch kostimulatorische Signale erforderlich. Die Bindung von B7, eines Oberflächenproteins

aus der Immunglobulin-Superfamilie, auf den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) mit CD28-Molekülen auf der T-Zelle führt zu einer Signalübertragung innerhalb der T-Zelle was wiederum zu einer Proliferation von T-Zellen, einem erhöhten Überleben von T-Zellen und einer Differenzierung durch die Produktion von Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2), einem erhöhten Energiestoffwechsel und einer Hochregulation von Zellüberlebensgenen führt (50).

Im Falle eines starken TCR-Stimulus wird die CTLA-4-Expression durch erhöhten Transport zur Zelloberfläche hochreguliert. CTLA-4 konkurriert mit CD28 um die Bindung von B7-Molekülen. Eine erhöhte CTLA-4:B7-Bindung führt zur Einschränkung der IL-2-Produktion und -Proliferation und des Überlebens der T-Zellen (50).

Ipilimumab, ein monoklonaler anti-CTLA-4-Antikörper, war der erste Immun-Checkpoint-Inhibitor (ICI), der zur Behandlung von Krebs entwickelt wurde. CTLA-4 ist jedoch ein Immunglobulin, das nicht nur in Krebszellen exprimiert wird, sondern auch in nicht-malignen Zellen, was zu schweren Nebenwirkungen wie Entzündungs- und Autoimmuntoxizitäten führen kann (28).

Der programmierte Zelltod-1-Rezeptor wird auf zytotoxischen T-Zellen und T-regulatorischen Zellen exprimiert, wenn T-Zellen als Reaktion auf Entzündung oder Infektion in peripheren Geweben aktiviert werden. Bindung des PD-1-Liganden (PD-L1) an seinen Rezeptor inaktiviert die T-Zelle, und bewirkt somit eine Immunsuppression (51). Krebszellen exprimieren PD-1, wodurch sie vor einem natürlichen Immunangriff verborgen bleiben. *Herbst et al.* zeigten, dass die PD-L1-Expression mit dem Ansprechen auf die Immuntherapie korreliert; höhere PD-L1-Expression ist mit einem höheren und langfristigen Ansprechen assoziiert (52).

Mit dem Ansprechen auf die Immuntherapie ist auch die Belastung durch Tumormutationen (engl. tumor mutational burden, TMB) verbunden. In einer Reihe von Studien könnte gezeigt werden, dass ein höherer TMB-Wert, mit einem besseren Ansprechen auf ICI assoziiert ist. Da auch die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mit dem Ansprechen auf die Immuntherapie korreliert, werden in den meisten kommerziellen Labors PD-L1-Expression, TMB und MSI-Status untersucht, um die Therapieentscheidungen zu lenken(53).

Bis dato, hat die US-amerikanische Arzneimittelbehörde (FDA) die Verwendung von vier verschiedenen ICI (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab und Durvalumab) für die klinische Anwendung zugelassen (49). Viele andere ICI, die die zukünftigen Behandlungsoptionen für Patienten mit fortgeschrittenem Krebs revolutionieren könnten, befinden sich in der aktiven klinischen Entwicklung (50).

### 1.3.3. Liquid Biopsy

*Gerlinger et al.* zeigten mithilfe umfassender Charakterisierung mehrerer Tumorproben desselben Patienten, dass eine intratumorale Heterogenität zwischen verschiedenen Regionen desselben Tumors (räumliche Heterogenität) sowie zwischen dem Primärtumor und lokalen oder entfernten Rezidiven desselben Patienten (zeitliche Heterogenität) besteht (54). Darüber hinaus stellt die klonale Evolution, die zu bösartigem Wachstum, Invasion, Metastasierung und Resistenzbildung führt, eine weitere Herausforderung für die korrekte Diagnose und anschließende Therapieentscheidung dar (55). Das genetische Profil solider Tumoren wird derzeit routinemäßig aus Biopsieproben ermittelt. Eine Gewebe-Biopsie liefert aber nur eine räumlich und zeitlich begrenzte Momentaufnahme eines Tumors, und kann dessen Heterogenität nicht vollständig widerspiegeln (56). Zudem ist es in vielen Fällen, vor allem bei synchron metastasierten Patienten, nicht immer möglich, Tumormaterial in ausreichender Qualität und Menge für eine molekulare Charakterisierung zu gewinnen.

Aus diesen Gründen und aufgrund der Tatsache, dass sich die Medizin immer weiter in Richtung personalisierter Medizin entwickelt, war es erforderlich eine nicht-invasive Methode zu finden und in der Praxis zu etablieren, die in Gegensatz zu herkömmlichen Gewebe-Biopsien regelmäßig durchgeführt werden könnte und eine größere Menge an Informationen über Tumorgenom liefern kann. Ein solcher Ansatz ist eine sog. Liquid Biopsy (Flüssigkeitsbiopsie), bei der die genetische Zusammensetzung des Tumors anhand einer Biofluidprobe beurteilt werden kann (57). Die Einführung der Liquid Biopsy in die Klinik könnte Verbesserung der Diagnostik der Tumoren, deren Früherkennung, die Unterstützung bei der Therapiewahl nach Auffindung eines Tumors und das Monitoring einer möglichen Resttumor-Aktivität, Früherkennung von

Rezidivtumore als auch die Entschlüsselung deren gegebenenfalls verändertes molekulares Profils gewährleisten (58).

Im Zuge einer Liquid Biopsy wird meist Blut des Patienten entnommen, aber auch die anderen leicht zugänglichen Flüssigkeiten wie Urin, Aszites oder Pleuraergüssen können zur Bestimmung der genetischen Landschaft des Tumors herangezogen werden (59, 60).

Es wurde gezeigt, dass vom Tumor stammenden Komponenten in diesen Flüssigkeiten den Status der primären und metastasierten Erkrankungen widerspiegeln (61). Diese von dem Tumor stammende Komponenten unterscheiden sich stark in der Natur, so wurden zirkulierende Tumorzellen (CTCs; erstmals 1869 von Thomas Ashworth beschrieben), zellfreie zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA), zirkulierende freie RNA (cfRNA; vorwiegend kleine RNAs, aber auch mRNAs), zirkulierende extrazelluläre Vesikel (EVs) - wie Exosomen und tumorausgebildete Thrombozyten (TEP), Proteine und Metaboliten beschrieben (60).

Einige von diesen Komponenten werden bereits als Biomarker verwendet. So wird beispielsweise, die Anzahl von CTCs als Surrogatmarker für das Tumorstadium sowie für die Definition der Tumoraggressivität als relevant angesehen. Eine Abnahme der Anzahl von CTCs während der Behandlung wird mit der Tumorantwort auf Strahlentherapie in Verbindung gebracht während eine Zunahme der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen das Fortschreiten des Tumors voraussagt. Darüber hinaus ist bei NSCLC-Patienten die Gesamtzahl der CTCs vor Beginn der Chemotherapie mit dem Staging assoziiert (höhere nachweisbare Zellzahl bei Patienten im Stadium IV), und das PFS und das Gesamtüberleben (OS) scheinen ebenfalls mit der CTC-Anzahl zu korrelieren (62). Ein weiterer, vielversprechender Biomarker ist jedenfalls die zellfreie DNA, mit der wir uns in dieser Arbeit beschäftigen.

#### 1.3.4. Zirkulierende freie DNA (cfDNA)

Im Jahr 1948 haben *Mandel* und *Métais* (63) erstmals das Vorhandensein von zirkulierender zellfreier DNA (engl. cell-free DNA, cfDNA) im Blut bzw. im Plasma von Menschen beschrieben. Erst 29 Jahre später berichteten Forscher, dass die Hälfte der in die Studie einbezogenen Krebspatienten einen höheren Anteil an cfDNA in Vergleich

mit der gesunden Kontrollgruppe hatte. Im Serum von Patienten mit metastasierender Erkrankung wurden signifikant höhere cfDNA-Spiegel gefunden im Vergleich zu nicht-metastatischen Patienten. Nach der Strahlungs-therapie kam es zum Abstieg der Konzentration der cfDNA (64). Aufgrund der technischen Einschränkungen war eine weitere Charakterisierung der cfDNA fast unmöglich. Erst im Jahr 1994 ist es Forschern gelungen, eindeutig nachzuweisen, dass ein Teil der cfDNA, aufgrund des Vorhandenseins charakteristischer Krebsmutationen, aus Tumorgewebe(n) stammt (65–67). Mit dem Aufkommen der NGS-Technologien in Kombination mit den frühen Befunden von CGP (Cancer Genome Project) wurden dann erhebliche Fortschritte gemacht, die zu einer signifikanten Verbesserung der Sensitivität und Spezifität des Nachweises von ctDNA führten (67–69).

Der Anteil an ctDNA kann stark variieren und macht vor allem bei Patienten in früheren Stadien der Krankheit oft nur <1,0% der gesamten cfDNA aus. Obwohl auch in fortgeschrittenen Stadien eine erhebliche Variabilität beobachtet wird, findet man oft ctDNA-Fractionen von 50% bis 90% der cfDNA im Plasma (70). Die restliche cfDNA stammt aus Gewebe(n) mit einem hohen Zellumsatz bzw. einer hohen Zellproliferationsrate und einem hohen Zelltod wie zum Beispiel normale regenerierende Gewebe in verschiedenen Zuständen, einschließlich Hämatopoese, Immunreaktionen, entzündliche Prozesse, Apoptose und Nekrose. (71)

CtDNA kann unterschiedlich groß sein, wohingegen die DNA, die aus apoptotischen Zellen freigesetzt wird, gleichmäßig in Fragmente von 160-200 bp geschnitten wird. Da die Hauptquelle für cfDNA bei gesunden Personen apoptotische Zellen sind, könnte ein Übergewicht längerer DNA-Fragmente ein Marker für die Erkennung von malignen Tumoren sein (72, 73). Andere Studien weisen wiederum auf das Vorhandensein von kürzeren Fragmenten bei Tumorpatienten hin (74)

Die klinischen Einsatzmöglichkeiten der Liquid Biopsy sind vielfältig (59, 60). In unzähligen Studien konnte gezeigt werden, dass hohe ctDNA Level mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Zudem kann ctDNA zur Therapieüberwachung herangezogen werden, da sich verändernde ctDNA Level das Therapieansprechen widerspiegeln. ctDNA Analysen ermöglichen auch eine nicht-invasive Verfolgung der Tumorevolution, wobei neu auftretende genetische Veränderungen, die einerseits zu

Resistenzen gegenüber zielgerichteten Therapien führen können, aber auch neue therapeutische Ziele darstellen können, detektiert werden können. Dies ist insbesondere bei Lungenkrebs-Patienten von großer klinischer Relevanz, da eine Biopsie oftmals aufgrund der Lokalisation des Tumors nicht möglich und nicht wiederholbar ist. Beispielsweise könnte ein Patient, der mit Erlotinib wegen eines Lungenkrebses mit *EGFR*-Exon-19-Deletion behandelt worden war, später eine Mutation im *EGFR* entwickeln, die eine Resistenz gegen Erlotinib verleiht. Liquid Biopsie und ctDNA finden hierher einen starken Anwendungsbereich. Die Entnahme von Blutproben zum Zeitpunkt des Wiederauftretens oder Fortschreitens des Tumors, gefolgt von einer *EGFR*-Mutationsanalyse, kann den Klinikern helfen, zu entscheiden, ob aufgrund einer erworbenen Resistenzmutation eine Therapieumstellung erforderlich ist (75). Eine kontinuierliches Tumor-Monitoring mittels Mutationsanalysen, die in der Onkologie von der enormen Bedeutung sind, wurden erst durch die leichte Zugänglichkeit der ctDNA und Liquid Biopsie gewährleistet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die auf der ctDNA-Analyse basierende Liquid Biopsie aufgrund ihrer hohen Genauigkeit und Sensitivität die nächste Generation der Tumordiagnostik und Prognosetests darstellen könnte (67).

### 1.3.5. Methoden zur ctDNA-Analyse

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Analytik der ctDNA gemacht. Dies betrifft besonders die analytische Sensitivität und Spezifität die einerseits durch die Verwendung von modifizierten Polymerasen mit einer reduzierten Fehlerrate, andererseits durch die Verwendung von digitalen Methoden und ausgefeilten bioinformatischen Algorithmen erhöht wurde (76). Wie in der **Abbildung 1** dargestellt, ist für die Auswahl der Methode der Analyse der Anteil an ctDNA in der cfDNA entscheidend. Wenn die ctDNA in Plasma unter 1% liegt, sind die zielgerichtete, hochauflösende Methoden notwendig, um tumorspezifische Mutationen nachzuweisen. Bei einem Anteil an ctDNA von mehr als 5-10% ist, können auch umfassende genomweite Methoden mit geringer analytischer Sensitivität angewandt werden (76).

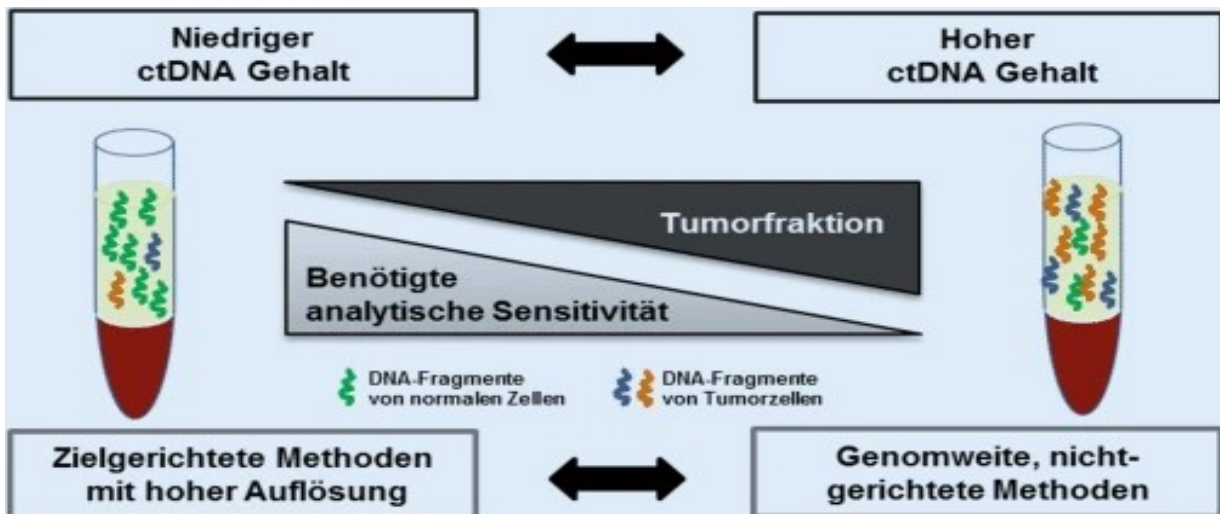


Abbildung 1: Methoden zur ctDNA Analyse.

Für den Nachweis von geringen Mengen an ctDNA werden hochauflösenden zielgerichtete Methoden verwendet. Wenn ein höher ctDNA Gehalt vorliegt können auch die genomweiten Methoden angewandt werden. Quelle Heitzer E., 2016 (1)

### Zielgerichtete Methoden

Mit den meisten zielgerichteten Methoden werden entweder bekannte Mutationen und Hotspots oder eine ganze Reihe von Krebs-assoziierten Gene analysiert (76). Beispiele hierfür - wie ARMS (engl. amplification-refractory mutation system) (77), dPCR (engl. digital polymerase chain reaction) (78), BEAMing (engl. beads, emulsion, amplification, magnetics) (79), Cast-PCR (engl. Competitive allele-specific TaqMan PCR) (80), TAM-Seq (engl. Tagged Amplicon sequencing) (81) CAPP-Seq (engl. CAnCer Personalized Profiling by deep Sequencing) (82) und CAPP-Seq & iDES (engl. CAnCer Personalized Profiling by deep Sequencing and integrated Digital Error Suppression) - sind mitihren Vorteilen, Nachteilen und Detektionslimits (LOD) in der Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Ausgewählte zielgerichtete Methoden zur Analyse von ctDNA.

Methoden	Vorteile	Nachteile	LOD (%)*
<b>ARMS (77)</b>	Hohe analytische Sensitivität & Spezifität, günstig	Mutation muss bekannt sein, nur einzelne, wenige Zielregionen analysierbar	Bis zu 0,001

<b>dPCR (78)</b>	Hohe analytische Sensitivität & Spezifität	Mutation muss bekannt sein, nur einzelne, wenige Zielregionen analysierbar, spezielles Equipment erforderlich, teuer	Bis zu 0,0005
<b>BEAMing (79)</b>	Hohe analytische Sensitivität & Spezifität	Mutation muss bekannt sein, nur einzelne, wenige Zielregionen analysierbar, spezielles Equipment erforderlich, teuer	0,001
<b>Cast PCR (80)</b>	Gute analytische Sensitivität & Spezifität	Mutation muss bekannt sein, nur einzelne, wenige Zielregionen analysierbar	0,10
<b>Detektion von Fusionsbruchpunkten mit dPCR</b>	Sehr gute Spezifität	Identifikation der Bruchpunkte aufwendig, teuer	0,001
<b>Cancer Hotspot Panels</b>	Analyse von klinisch relevanten Targets	Fehlende analytische Sensitivität	1-5
<b>TAm-Seq (81)</b>	Hohe Flexibilität für personalisierte Assays	Fehlende analytische Sensitivität	2
<b>CAPP-Seq (82)</b>	Hohe diagnostische Sensitivität	Aufwendige Analytik	0,40
<b>CAPP-Seq &amp; iDES (83)</b>	Hohe analytische und diagnostische Sensitivität	Hohe analytische und diagnostische Sensitivität	0,0025

\*LOD (Detektionslimit, engl. Limit of detection). In Anlehnung an Ulz et al., 2016 (76).

## Molekulare Barcodes

Vor der Sequenzierung wird normalerweise ein PCR-Amplifikationsschritt durchgeführt, um sicherzustellen, dass ausreichend DNA für die Sequenzierung und/oder Anreicherung von Fragmenten mit erfolgreicher Adapterligation vorhanden ist. Um PCR-Duplikate in Sequenzierungsexperimenten mit hohem Durchsatz zu identifizieren und eine Fehlerkorrektur zu ermöglichen, werden immer öfters willkürliche

Barcodes, die als Unique Molecular Identifiers (UMIs) bezeichnet werden, verwendet (84).

Diese molekularen Barcodes stellen willkürliche Abfolgen von N-Basen (A, T, G oder C) dar, die in jedem zu analysierenden Ausgangs-DNA-Molekül vor der PCR-Amplifikation eingebaut werden. Die Amplifikation dieser „getagget“ Matrizen resultiert in vielen Tochtermolekülen, die alle den gleichen UMI tragen. Diese werden als eine UMI-Familie definiert. Wenn in dem zur Amplifikation verwendeten Matrizenmolekül eine Mutation vorhanden war, sollte diese Mutation in jedem Tochtermolekül vorhanden sein, welches denselben UMI enthält (mit Ausnahme etwaiger nachfolgender Replikations- oder Sequenzierungsfehler). Eine UMI-Familie, in der mindestens 95% der Familienmitglieder die identische Mutation aufweisen, wird als „Supermutant“ bezeichnet. Mutationen, die in den Matrizenmolekülen nicht auftreten, wie beispielsweise die, die während der Amplifikation oder durch Fehler beim Basenaufbau auftreten, sollten keine Supermutanten hervorrufen (85). Durch die Verwendung von UMIs ist es möglich, echte PCR-Duplikate genau zu identifizieren, weil sie sowohl identische Ausrichtungskoordinaten als auch identische UMI-Sequenzen aufweisen, und die Genauigkeit bei der Sequenzierung zu verbessern und somit verhindern, dass die falschen Basen detektiert (gecalled) werden (84).

## Genomweite Methoden

Mit den genomweiten Methoden, die in der Tabelle 2 dargestellt sind, werden in der Regel keine einzelnen Mutationen analysiert und daher setzen sie auch keine Kenntnis über genomische Landschaft des Tumors voraus. Diese Methoden ermöglichen nicht nur eine genomweite Bestimmung von somatischen Kopienzahlveränderungen (SCNA, engl. somatic copy number alteration), die kennzeichnend für 90% der soliden bzw. 50% der hämatologischen malignen Tumoren sind (86), sondern auch Einblicke in die Heterogenität und Evolution der Tumore (76).

Seit der Einführung des NGS werden Array-CGH und SNP-Array, die traditionell für die Kopienzahlanalysen verwendet wurden, zunehmend durch eine Genomsequenzierung mit geringer Sequenziertiefe (engl. shallow whole genome sequencing, sWGS) abgelöst. Im Zuge des sWGS wird das Genom virtuell in definierte Abschnitte unterteilt,

in denen dann die generierten Sequenzinformationen gezählt und mit einer Referenz (einem Erwartungswert bzw. einer Kontrollpopulation) verglichen werden (76).

Table 2: Ausgewählte genomweite Methoden zur Analyse von ctDNA.

Methoden	Vorteile	Nachteile	LOD (%)*
<b>Whole exome sequencing</b>	Umfassende Analyse	Fehlende analytische Sensitivität, keine SCNAs	5
<b>Array-CGH</b>	Umfassende Analyse, Bestimmung von SCNA	Fehlende analytische Sensitivität, keine Mutationsdaten	10
<b>SNP-Arrays</b>	Umfassende Analyse, Bestimmung von SCNA	Fehlende analytische Sensitivität, keine Mutationsdaten	10
<b>sWGS</b>	Umfassende Analyse, Bestimmung von SCNA	Fehlende analytische Sensitivität, keine Mutationsdaten	5-10
<b>mFAST-SeqS</b>	Umfassende Analyse, Bestimmung von SCNA	Fehlende analytische Sensitivität, keine Mutationsdaten	5-10

\*LOD (Detektionslimit, engl. Limit of detection). In Anlehnung an Ulz et al., 2016 (76).

## FAST-SeqS

Fast Aneuploidy Screening Test- Sequencing System (FAST-SeqS) ist eine von *Kinde et al.* entwickelte 2-Schritt-PCR Methode, die der Amplifikation der acht Subfamilien von *LINE-1* (lange gesteuerte Nukleotidelemente, engl. long interspersed nucleotide element) dient. *LINE-1* Sequenzen sind Retrotransposons, die über das gesamte Genom verteilt sind (85). Vor kurzem wurde sie am Institut für Humangenetik von *Belic et al.* Weiterentwickelt. Während *Kinde et al.* die Methode verwendet haben, um read-calls und z-Score Analyse für ganze Chromosomen zur Detektion von Trisomien durchzuführen, wurde die als mFAST-SeqS (modifizierte FAST-SeqS) bezeichnete Methode auf die Analyse der Chromosomenarme erweitert (81). mFAST-SeqS wird

aber primär nicht zur Detektion von Aneuploidien verwendet, sondern hauptsächlich zur Stratifikation von Patienten anhand ihres ctDNA-Gehalts in Plasma verwendet.

Dabei werden die generierten *LINE-1* Sequenzen nach der Sequenzierung gegen das Genom kartiert und pro Chromosomenarm gezählt. Durch den Vergleich mit einer Referenz (Kontrollproben) wird das Ausmaß der Abweichung von Readcounts in einem z-Score zum Ausdruck gebracht. Die chromosomenspezifischen z-Scores werden dann quadriert und aufsummiert. Die Summe ist ein generelles Maß für Aneuploidie und reflektiert den Anteil an ctDNA in der Probe. Dies ermöglicht eine Beurteilung, ob der tumorspezifische DNA-Anteil ausreichend für die Detektion von Kopienzahlveränderungen mittels sWGS (plasma-Seq) Analyse ist (87).

Kürzlich wurde eine Weiterentwicklung der FAST-SeqS Methode von dessen Erfindern, das sog. "Within-Sample Aneuploidy DetectiOn" (WALDO; Aneuploidie-Erkennung innerhalb einer Stichprobe) veröffentlicht. genannt (88). Durch die Verwendung UMIs in Kombination mit korrespondierender, konstitutioneller DNA können tumorspezifische *LINE-1* Mutationen erkannt werden, was wiederum die Abschätzung der Mutationslast bzw. eine Auswertung von karzinogenen Signaturen und Erkennung von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ermöglichen könnte.

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war primär die Etablierung der WALDO-Methode im Liquid Biopsy Labor des Instituts für Humangenetik inklusive der Etablierung der bioinformatischen Pipeline für das Variant Calling und MSI-Bestimmung. Nach der Etablierung sollte die WALDO mit der am Institut entwickelten mFAST-SeqS Methode, hinsichtlich der Aneuploidiedetektion sowie der Stratifikation von Patienten anhand Tumorgehalt verwendet werden.

Zudem wurde die Anwendbarkeit der mittels WALDO bestimmten Mutationslast in *LINE-1*-Sequenzen als Surrogatmarker für TMB bei NSCLC-Patienten untersucht. TMB und MSI sind laut mehreren klinischen Studien vielversprechende Biomarker für das Ansprechen auf Immuntherapie. Da für die Bestimmung des TMB mindestens eine

Megabase sequenziert werden muss, was mit hohen Kosten verbunden ist, könnte WALDO eine rasche und kostengünstige Alternative für eine Stratifikation von Patienten aufgrund dem zu erwartenden Ansprechen auf Immuntherapie. darstellen.

Hypothese:

*„Eine WALDO-basierte Mutationsanalyse von LINE-1-Mutationen kann als Surrogat für TMB verwendet werden und die Ansprechraten von NSCLC-Patienten auf ICI verbessern.“*

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patienten und Kontrollmaterialien

Für die Etablierung des Protokolls wurde hochqualitative genomische DNA (hgDNA) der Firma Promega verwendet. Zudem wurde das WALDO Protokoll mit Plasma-DNA-Proben (pDNA) von metastierten Krebspatienten (n = 12) und korrespondierender konstitutioneller DNA aus Wangenabstrichen getestet.

Um die Haupthypothese, ob eine WALDO-basierte *LINE-1* Mutationsanalyse als Surrogat für eine TMB-Bestimmung herangezogen werden kann, wurden vorhandene Proben einer laufenden Studie, die in Zusammenarbeit mit unseren Cancer-ID-Partnern Ed Schuurin und Harry Groen (Universitätsklinikum Groningen, eng. **University Medical Center Groningen - UMCG**) durchgeführt wird, verwendet (METc approval number METc 2017/217).

Diese Kohorte enthielt Patienten mit NSCLC, die mit Immuntherapie behandelt wurden. Zusätzlich zu pDNA wurde konstitutionelle DNA aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (eng. peripheral blood mononuclear cells - PBMC) analysiert. Insgesamt wurden 57 Patienten analysiert (vollständiges Ansprechen [CR] n = 4; partielles Ansprechen [PR] n = 18; stabile Erkrankung [SD] n = 16; progressive Erkrankung [PD] n = 19).

### 3.2. DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA aus Buffy Coat erfolgte mittels Gentra Puregene Blood Kit entsprechend dem Protokoll (89). Die pDNA war bereits von Weber Sabrina, MSc., mithilfe von QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (50), Cat No./ID: 55114, von Firma Qiagen isoliert worden.

### 3.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels Qubit dsDNA HS/BR Assay Kit der Firma ThermoFisher Scientific laut dem Protokoll bestimmt.

### 3.4. Etablierung des WALDO Protokolls

In einem ersten PCR Schritt (Template-spezifische PCR) werden mit einem Primerpaar, das UMI enthält spezifisch tausende von *LINE-1* Sequenzen amplifiziert. In der zweiten PCR werde dann die Probenspezifischen Indexsequenzen angefügt.

Im Zuge der Etablierung des WALDO Protokolls wurden unterschiedliche Mengen an Input DNA sowie UMI Kombinationen ausgetestet. UMIs bestehen aus einer willkürlichen Abfolge von N-Basen. Das „N“ steht für die Basen A, T, G oder C und können entweder nur an einen oder beider Primer angefügt werden. Um die optimale Menge an Ausgangs-DNA zu bestimmen, wurde die Library Preparation mit 0,5ng, 1ng und 1,5ng an hochqualitativer genomischer DNA (hgDNA) der Firma Promega, durchgeführt.

Es wurden auch zwei Primer-Paare ausgetestet, die UMIs (unique molecular identifier) enthalten. Das erste Primer-Paar (UMI6) beinhaltet zusätzlich sechs Basen, jeweils im Forward (Fwd 6-UMI) und im Reverse (Rev 6-UMI) Primer. Im Forward Primer (Fwd 12-UMI) des zweiten Primer-Paares (UMI12-R1) wurden zwölf Basen eingefügt, während der Reverse Primer keine UMIs enthält. Die Primer-Sequenzen sind in der **Tabelle 3** dargestellt.

**Tabelle 3: Die für Library Preparation verwendeten Primer-Paare.**

Primer-Paar	Primer	Sequenz*
UMI6	Fwd 6-UMI	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNACACAGGGAGGGGAACAT
	Rev 6-UMI	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNTGCCATGGTGGTTTGCT
UMI12-R1	Fwd 12-UMI	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNNACACAGGGAGGGGAACAT
	Rev R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCCATGGTGGTTTGCT

\*N, degenerierte Abfolge von Nukleotiden für den UMI

### 3.4.1. Protokoll

Template-spezifische PCR (PCR1) wurde laut dem Protokoll in

**Tabelle 4** durchgeführt.

**Tabelle 4: Ansatz die für die Template-spezifische PCR.**

5x Phusion HF Buffer	10 µL
10 µM F+R UMI Primer	2,5 µL
10 mM dNTPs	1 µL
Phusion Polymerase	1 µL
NF-H <sub>2</sub> O	Variabel*
DNA	Variabel*
<b>Gesamt</b>	<b>50 µL</b>

\*Das Volumen an Wasser hängt von der Menge [ng] bzw. Volumen der eingesetzten DNA [µL] ab.

PCR Programm 1:

- 98°C → 120 Sekunden
- 98°C → 10 Sekunden |
- 57°C → 120 Sekunden | 2x
- 72°C → 120 Sekunden |
- 4°C → für immer

Aufreinigung des PCR1-Produktes

- Zentrifugieren der PCR-Tubes
- 50 µL PCR1-Produktes mischen mit 70 µL Ampure XP Beads (Agencourt)

- Inkubation der Proben für 10 Minuten bei RT
- Inkubation der Proben für 5 Minuten bei RT am Magnetständer
- Überstand verwerfen
- Waschen mit 200 µL 70% Ethanol (EtOH direkt auf Beads pipettieren), den Überstand verwerfen und den Waschschrift wiederholen
- Überstand verwerfen. Das Pellet für 10 Minuten bei RT trocknen lassen
- Das Pellet in 11 µL 1xTE (pH 8.0) resuspendieren
- Inkubation der Proben für 2 Minuten bei RT
- Die Proben 2 Minuten bei RT im Magnetständer inkubieren.
- 10 µL Überstand für die Index-PCR in neue PCR-Tubes überführen

Indexierung und Amplifikation der Library (PCR2) laut folgendem Protokoll (Tabelle 5):

*Tabelle 5: Ansatz für die Amplifikation der Library (PCR2).*

5x Phusion HF Buffer	10 µL
10 µM F+R Index-Primer	2,5 µL
10 mM dNTPs	1 µL
Phusion Polymerase	1 µL
NF-H <sub>2</sub> O	25,5 µL
PCR1-Produkt	10 mL
<b>Gesamt</b>	<b>50 µL</b>

PCR Programm 2:

- 98°C → 120 Sekunden
- 98°C → 10 Sekunden |
- 57°C → 15 Sekunden | 20x
- 72°C → 15 Sekunden |
- 4°C → für immer

Aufreinigung des PCR2-Produktes

- Zentrifugieren der PCR-Tubes
- 50 µL PCR1-Produktes mischen mit 70 µL Ampure XP Beads
- Inkubation der Proben für 10 Minuten bei RT
- Inkubation der Proben für 5 Minuten bei RT am Magnetständer
- Überstand verwerfen
- Waschen mit 200 µL 70% Ethanol (EtOH direkt auf Beads pipettieren), den Überstand verwerfen und den Waschschrift wiederholen
- Überstand verwerfen, das Pellet 10 Minuten bei RT trocknen lassen
- Das Pellet in 11 µL 1xTE (pH 8.0) resuspendieren
- Inkubation der Proben für 2 Minuten bei RT
- Die Proben für 2 Minuten bei RT im Magnetständer inkubieren
- 10 µL Überstand in 1,5 mL Eppendorf-Tubes überführen
- Bestimmung der DNA-Konzentration der Proben mittels Bioanalyzer DNA 7500 Kit

Die Ermittlung der DNA Konzentration und Größe der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agilent 2100 Bioanalyzer System (Bioanalyzer DNA 7500 Kit) der Firma Agilent Technologies laut Protokoll (90).

### 3.5. Bioinformatische Verarbeitung von Daten

Die bioinformatische Verarbeitung der Daten wurde von Herr Dipl.-Ing. BSc Benjamin Spiegl, der als Bioinformatiker am Institut für Humangenetik beschäftigt ist, durchgeführt. UCSC GRCh38 + hs38d1 (Decoysequenzen) wurde als Referenzgenom verwendet.

#### Pipeline: Datenverarbeitung

1. **Adapter Trimming** (Input: Read1 + Read2 FastQs) → 1 Filter: Reads < 30 Basen nach Trimming
2. **Extrahierung und Entfernung der UMI-Sequenzen aus den Reads** → 3 Filter: Reads > 60% Ns; kein oder nur ein UMI erfolgreich lokalisiert/extrahiert; extrahierter UMI mit stark abweichender Länge

### 3. Read Alignierung gegen das menschliche Genom

4. **Alignment Filterung** → 2 Filter: Mates eines Alignment Paares auf unterschiedlichen Chromosomen; Alignment Paare ohne ordentliche Ausrichtung zueinander (not “mapped in proper pair”)
5. **Bildung der Konsens-Alignments** basierend auf UMIs und Mapping-Position → 4 Filter (entfernen Alignments vor der Konsensus-Bildung): niedrige Mappingqualität (<1; BWA-MEM: bei Reads die gegen mehrere Regionen alignieren); Reads ohne Alignment; zweites Alignment des Paares fehlt; Alignments einer vereinten UMI Familie, die andere Struktur aufweisen(d.h. anderer CIGAR Text; z.B. bei Indel-Unterschieden)
6. **Variant Calling** → 1 Filter: Varianten in Regionen, die in der genomischen DNA Probe nicht (mit Alignments) abgedeckt sind; Varianten die durch das GATK Kommando “FilterMutectCalls” entfernt werden
7. **Extraktion von Indels aus Homopolymer Regionen** (z.B. poly(A))
8. **Varianten Filterung** (gesamtes Callset und Homopolymer Indels) → 3 Filter: NUR jene Varianten werden beibehalten, bei denen die Filter-Spalte in der VCF Datei ausschließlich aus folgenden Filtern besteht: PASS, strand\_artifact, multiallelic, read\_position, str\_contraction, strict\_strand\_bias, read\_orientation\_artifact; Varianten Allelfrequenz (VAF) ist größer als 40%; UMI Tiefe der betroffenen Stelle ist unter 20.

### 3.6. Vergleich von WALDO mit mFAST-SeqS und plasma-Seq

Um WALDO hinsichtlich des Aneuploidiescreenings und der Stratifizierung der Proben nach Tumorgehalt mit mFAST-SeqS vergleichen zu können, wurden die Probe zusätzlich zum WALDO Algorithmus mit der mFAST-SeqS-Skript ohne Rücksichtnahme auf die UMIs ausgewertet.

Im Zuge des Vergleichs wurden pDNA von drei Prostatakrebspatienten verwendet. Für jede Probe wurde mFAST-SeqS als auch WALDO Library vorbereitet analysiert. Zudem wurden horizontale Kopienzahlplots erstellt um die chromosomenarm-

spezifischen Aneuploiden mit bereits vorhandenen Plasma-Seq Profilen zu vergleichen.

### 3.7. Sequenzierung

Um die Diversität der Basenkonposition bei der Sequenzierung zu erhöhen, wurden bei jedem Lauf plasma-Seq Proben zusammen mit den WALDO-Libraries sequenziert. Plasma-Seq Libraries wurden mittels dem TruSeq DNA Nano Kit der Firma Illumina hergestellt und mittel qPCR quantifiziert. Jeweils 30 WALDO-Libraries wurden mit drei plasma-Seq Libraries im Verhältnis 80:20 gepoolt und auf einem Illumina NextSeq Mid Output Kit mit 150 Zyklen paired end mode (76bp $\times$ 2) sequenziert.

#### 3.7.1. Protokoll

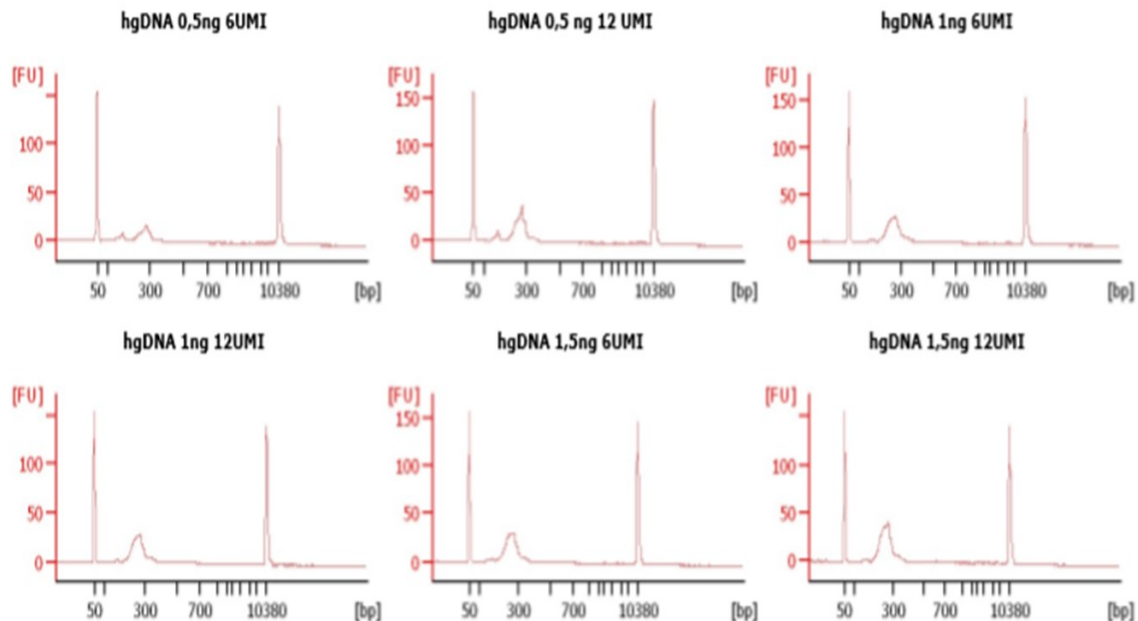
Vorbereitung: WALDO und plasma-Seq Libraries auf 4 nM verdünnen und poolen.

- Denaturierung und Verdünnung: 5  $\mu$ L 1M NaOH + 5  $\mu$ L Pool – Vortexen! Inkubation 5 Minuten bei RT. Zugabe von 990  $\mu$ L HT1-Puffer  $\rightarrow$  20 pM. Sobald Puffer dabei – Eis!
- plasma-Seq: 1 pM in 2000  $\mu$ L  $\rightarrow$  100  $\mu$ L von 20 pM PS + 1900  $\mu$ L Puffer
- WALDO: 1,2 pM in 2000  $\mu$ L  $\rightarrow$  120  $\mu$ L von 20 pM FS + 1880  $\mu$ L Puffer
- Final Pool: 80% 1,2 pM FS + 20% 1 pM PS
- Aufladen das Catridge mit 1300  $\mu$ L Final Pool

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Etablierung der Methode

Da das Anfügen von UMI die PCR Effizienz beeinträchtigen kann, wurde in erstem Schritt wurde das Library Preparation Protokoll mit verschiedenen Mengen an hochqualitativer genomischer Input-DNA der Firma Promega (0,5ng, 1,0ng und 1,5ng) und verschiedenen Primer getestet. Speziell wurde die PCR-Leistung bei der Verwendung von dualen 6bp-UMI-Primer in Vergleich mit einer einzelnen 12bp-UMI-Primer überprüft. Alle Input-Primer Kombinationen führten zu den zu erwartetem PCR-Produkten, wobei die Ausbeute bei höheren Inputmengen höher war (**Abbildung 2**)



**Abbildung 2: Übersicht von Bioanalyzer-Profilen der WALDO-Library Preparation unter Verwendung verschiedener Mengen an DNA-Input und zwei Primersätzen.**

Alle Kombinationen führten zu erwartenden PCR-Produkten, wobei die PCR-Produkt mit höchster Molarität bei einer Inputmenge von 1,5 ng in Kombination mit 12UMI Primer erzielt wurde.

Das Protokoll wurde ebenso mit pDNA von Krebspatienten (n=12) (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) und entsprechender gDNA (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) aus Wangenabstrichen als auch mit pDNA von gesunden Kontrollen (n=32) getestet. Für die Library Preparation wurden je 10µL von pDNA und 5µL von gDNA verwendet. Nach der Erstellung der DNA-Libraries wurden die Proben sequenziert. Die erste Datenanalyse hat gezeigt, dass eine bessere UMI Verteilung mit den dualen 6bp-UMI-Primer erzielt wurde.

Die pDNA aus gesunden Kontrollen (Männer, n=17; Frauen n=15) wurde zusätzlich verwendet, um Kontrolldaten für die Z-Score-Statistik des mFAST-SeqS Protokolls zu generieren.

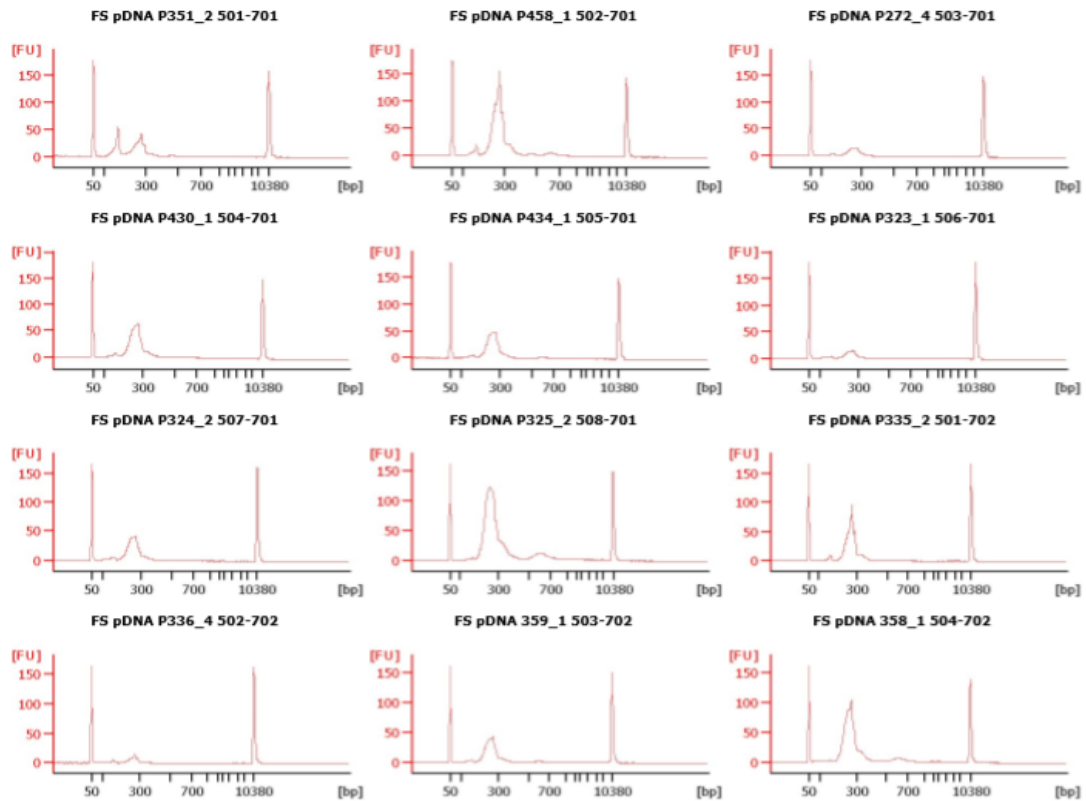


Abbildung 3: Übersicht von Bioanalyser-Profilen der WALDO-Library preparation von pDNA der Prostatakrebspatienten.

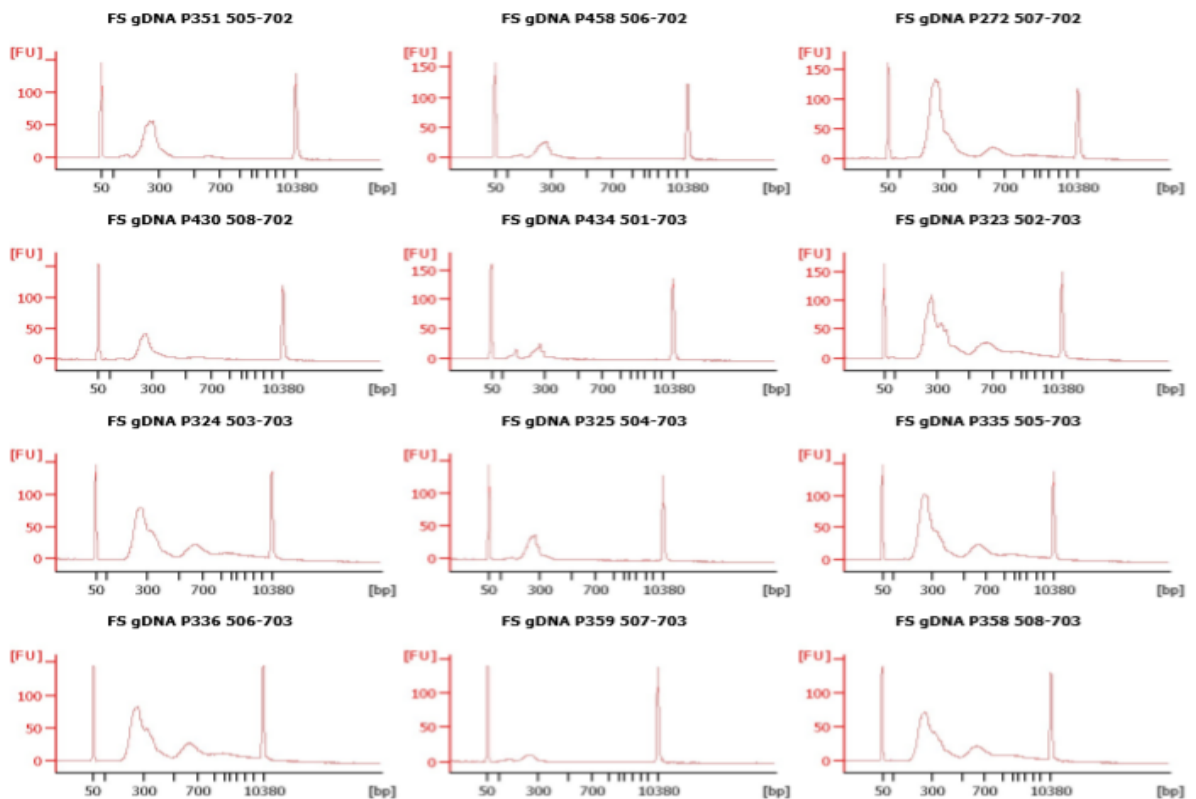
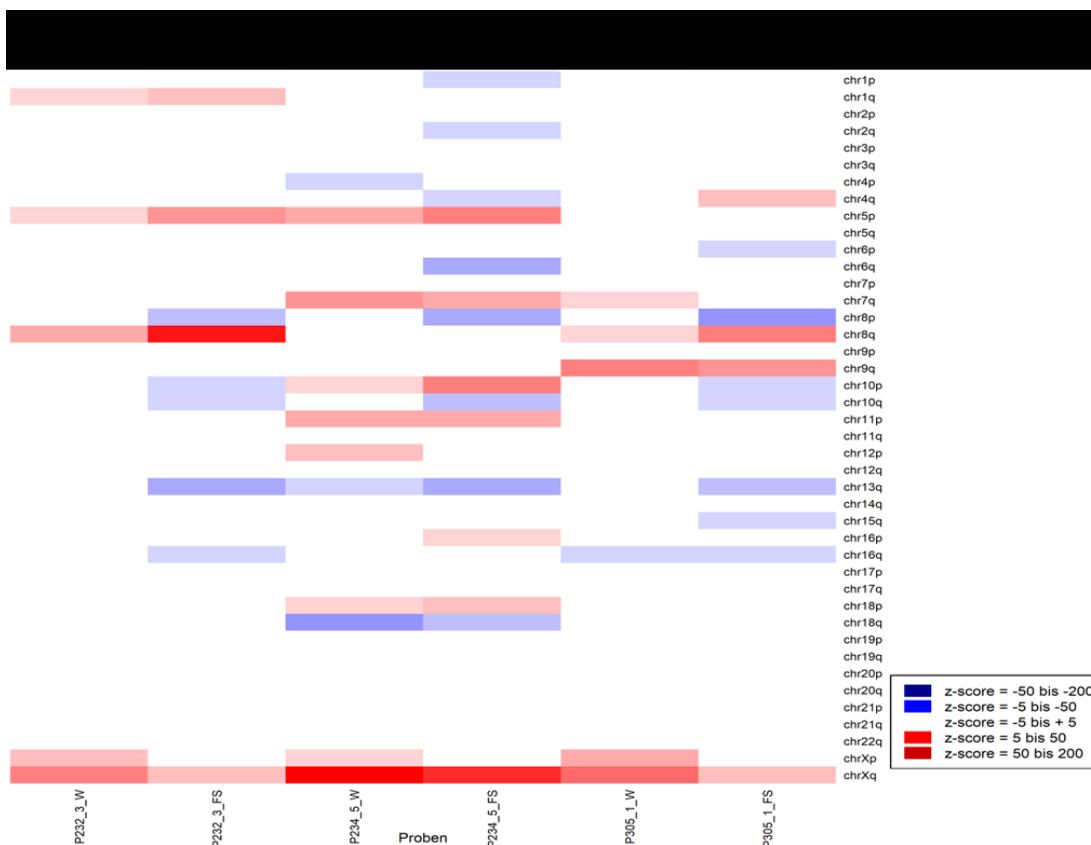


Abbildung 4: Übersicht von Bioanalyser-Profilen der WALDO-Library Preparation von gDNA der Prostatakrebspatienten.

## 4.2. Vergleich von WALDO und mFAST-SeqS

Um WALDO mit mFAST-SeqS im Hinblick auf die Bestimmung der Chromosomenarm-spezifischen Kopienzahlgewinne und -verluste bzw. der Abschätzung des Tumoranteils vergleichen zu können, wurde pDNA von drei Prostatakrebspatienten verwendet. Für jede Probe wurde sowohl eine mFAST-SeqS als auch WALDO Library vorbereitet, und mit dem mFAST-SeqS-Skript analysiert. Die anschließenden Z-Score-Statistiken wurden an jeden Chromosomenarm angewendet, und basierend auf diesen Werten wurden genomweiten Z-Scores, die die Abweichung von Kontrollproben (Referenz) angeben, berechnet. Chromosomenspezifische Z-Scores wurden dann in einer Heatmap geplottet. Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich, ergaben beide Protokolle ähnliche Ergebnisse.



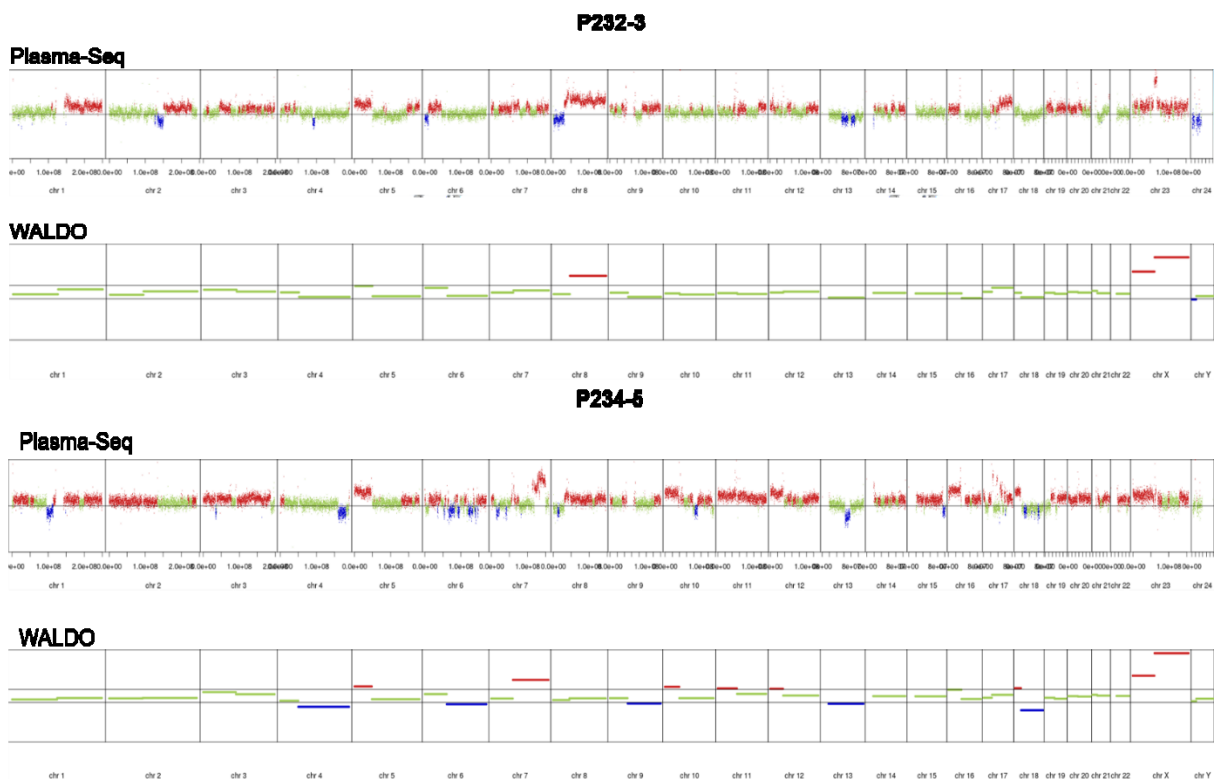
**Abbildung 5: Vergleich von WALDO und mFAST-SeqS im Hinblick auf Chromosomenarm-spezifische Kopienzahlveränderungen.**

Chromosomenarmverluste sind in blau (Z-score <5) und Chromosomenarmgewinne in Rot dargestellt (Z-score >5). Links WALDO (W), rechts mFAST-SeqS (FS).

### 4.3. Vergleich von WALDO und plasma-Seq

Zusätzlich zum Vergleich mit mFAST-SeqS wurden die WALDO Profile mit genomweiten Kopienzahlprofilen nach plasma-Seq verglichen. Von zwei der oben genannten Prostatakarzinom-Patienten (P232-3 und P234-5) war ein plasma-Seq Profile vorhanden. Für das WALDO-Kopienzahlprofil wurden drei verschiedene Referenzen herangezogen. Mit den Kontrolldaten für mFAST-SeqS bzw. den Read Counts der korrespondierenden gDNA Referenz zeigte sich eine höhere Variabilität als mit pDNA Kontrollproben, die ebenfalls mittels WALDO präpariert wurden.

Obwohl die Auflösung in Bezug auf Kopienzahlveränderungen von WALDO auf Chromosomenarme limitiert ist, konnte eine gute Übereinstimmung mit dem mit plasma-Seq ermittelten Kopienzahlen erzielt werden (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6: Korrelation von WALDO-genomweiten Kopienzahlprofilen mit Plasma-Seq Profilen von zwei Prostatakrebspatienten.**

*Balancierte Genomregionen sind in grün dargestellt, blau zeigt einen Zugewinn und rot einen Verlust an chromosomalen Regionen an.*

#### 4.4. WALDO-basierte Analyse von *LINE-1* Varianten

Um die klinische Anwendung der WALDO-Methode als alternative Methode der Erhebung des TMB zu testen wurden klinische Proben, von NSCLC-Patienten unter Therapie mit ICI, die am UMCG in Groningen im Rahmen einer Studie rekrutiert wurden, verwendet. Insgesamt wurde von 57 Patienten jeweils pDNA und gDNA mittels WALDO analysiert (vollständiges Ansprechen [CR] n = 4; partielles Ansprechen [PR] n = 18; stabile Erkrankung [SD] n = 16; progressive Erkrankung [PD] n = 19) (Tabelle 6). Bei diesen Patienten wurde zusätzlich zu einer Mutationsanalyse auch die mFAST-SeqS Analysepipeline angewendet. Eine Übersicht über die Patienten und die verwendete DNA Input Mengen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Die mFAST-SeqS Analysepipeline ergab für die Patienten einen mittleren genomweiten z-Score von 20,5 (Range -1,2 – 294,7). Überraschenderweise wurde der niedrigste z-Score von -1,2 bei einem Patienten mit fortschreitender Krankheit beobachtet, während der Patienten mit dem höchsten z-Score von 294,7 ein partielles Ansprechen auf die Immuntherapie gezeigt hat. Dieser Trend hat sich auch bei weiteren Patienten bestätigt, was darauf hinweist, dass Patienten, die auf die Immuntherapie nicht angesprochen, einen niedrigeren z-Score aufweisen (MW=12,5) als diejenigen, die ein Ansprechen auf Immuntherapie zeigten (MW=33,5).

Die z-Scores wurden anschließend in einer Heatmap eingetragen, in der die z-Scores niedriger als 5 als blaue und die höhere als 5 als rote Balken dargestellt wurden. **(Abbildung 7).**

Tabelle 6: Übersicht von zur Testung von etablierter Methode und Algorithmus verwendeten klinischen Proben.

sample ID	Patient ID	Input gDNA [ng]	Input pDNA [ng]	Z-score	VAF [%]	Response
952-0	952	50,00	15,50	26,6223204	15,90	PD
972-0	972	50,00	13,80	294,768112	67,20	PR
981-0	981	56,10	11,85	97,4755129	22,50	PD
986-0	986	50,00	28,70	0,23482204	<1,0	PD
990-0	990	86,10	17,10	-0,12952543	1,53	PD
1001-0	1001	17,35	29,10	0,5770198	6,19	SD
1002-0	1002	12,70	4,72	0,24500227	<1,0	SD
1015-0	1015	50,00	15,45	37,1296982	30,30	PD
1027-0	1027	50,00	30,75	16,4234708	16,60	PD
1031-0	1031	32,70	3,89	-0,13895569	<1,0	PR
1032-0	1032	50,00	8,15	0,05487744	2,80	PR
1038-0	1038	50,00	14,30	0,3995345	<1,0	PD
1043-0	1043	50,00	23,45	2,3588213	<1,0	SD
1047-0	1047	42,90	4,16	6,40500006	14,50	SD
1063-0	1063	50,00	5,20	0,32579849	<1,0	PR
1066-0	1066	50,00	15,65	4,1453796	3,72	PD
1068-0	1068	58,80	4,20	-0,28949991	<1,0	PR
1070-0	1070	54,30	3,23	1,36137798	<1,0	CR
1072-0	1072	8,30	4,70	0,37488205	NA	PR
1073-0	1073	50,00	5,35	9,34614491	8,32	SD
1077-0	1077	50,00	10,75	2,94543093	4,26	PD
1081-0	1081	23,90	82,00	37,4542744	35,42	PD
1089-0	1089	50,00	15,30	0,09086805	<1,0	PD
1091-0	1091	50,00	14,25	0,94198996	3,59	PR
1093-0	1093	21,20	3,17	1,90430537	4,65	PR
1094-0	1094	36,30	6,70	-0,10032792	2,81	SD
1096-0	1096	50,00	5,70	1,21039396	5,15	PR
1097-0	1097	13,90	4,06	-0,12072892	9,61	SD
1100-0	1100	50,00	18,55	0,99436386	<1,0	PD
1105-0	1105	19,10	4,08	-0,66949445	12,12	SD
1111-0	1111	6,81	3,47	0,41636747	<1,0	PR
1112-0	1112	12,10	4,50	124,132614	1,46	CR
1119-0	1119	21,80	3,57	-0,11666508	<1,0	PD
1132-0	1132	50,00	5,80	0,84149359	<1,0	PR
1133-0	1133	15,00	14,50	-0,19378465	5,57	PD
1136-0	1136	60,60	2,49	-0,19179239	<1,0	PD
1139-0	1139	7,20	8,95	-0,24344104	<1,0	SD
1143-0	1143	63,90	2,90	-0,15754872	<1,0	PD
1150-0	1150	9,85	37,20	25,0870084	35,51	PD
1154-0	1154	49,20	2,68	-0,07324427	<1,0	CR
1166-0	1166	50,00	3,89	0,07212936	<1,0	PR
1172-0	1172	51,15	16,25	0,05	1,71	SD
7005-0	7005	41,10	13,30	-1,26355805	6,83	PD
7006-0	7006	47,10	6,80	-0,2619702	<1,0	SD
7007-0	7007	51,00	22,50	0,87870027	3,82	SD
7009-0	7009	30,60	3,55	-1,20400125	<1,0	PR
7022-0	7022	57,15	26,10	0,89537304	45,60	PD
7027-0	7027	33,60	3,12	0,64254676	9,76	PR
7067-0	7067	41,70	4,35	-0,35202333	<1,0	SD
7075-0	7075	47,70	4,89	-0,45718616	<1,0	SD
7085-0	7085	50,00	9,65	87,6010617	20,00	SD
7098-0	7098	50,00	12,60	29,8243625	17,00	SD
7103-0	7103	26,00	3,28	-0,32040665	<1,0	PR
7110-0	7110	51,00	5,90	49,1230578	20,50	PR
7111-0	7111	37,20	3,88	-0,39750826	<1,0	PR
7153-0	7153	55,60	10,80	160,84921	32,20	CR
7155-0	7155	38,40	3,11	0,04793756	<1,0	PR

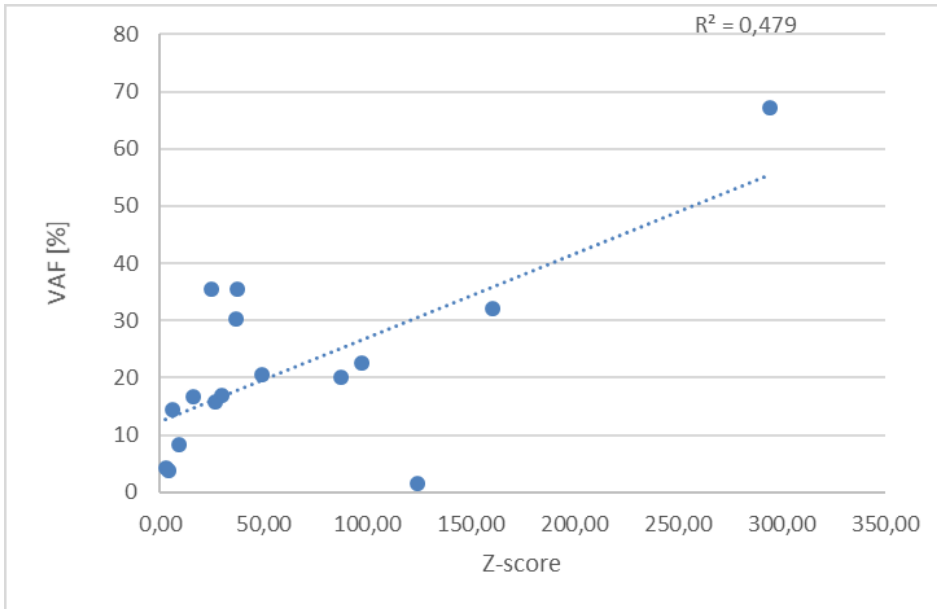
VAF (Varianten-Allel-Frequenz, eng. variant allele frequency); CR (vollständiges Ansprechen, eng. complete response); PR (partielltes Ansprechen, eng. partial response); SD (stabile Erkrankung, eng. stable disease); PD (progressive Erkrankung, eng. progressive disease). Hohe Z-Scores wurden rosarot hinterlegt



**Abbildung 7: Heatmap von WALDO-Plasmaproben von Patientinnen mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs mit verschiedenen genomweiten Z-Scores.**

Blaue Balken deuten chromosomenarmspezifische Z-Scores kleiner als fünf (<5) an (Chromosomenarmverluste), rote die, die größer als fünf sind (>5) (Chromosomenarmgewinne). Chr, Chromosom.

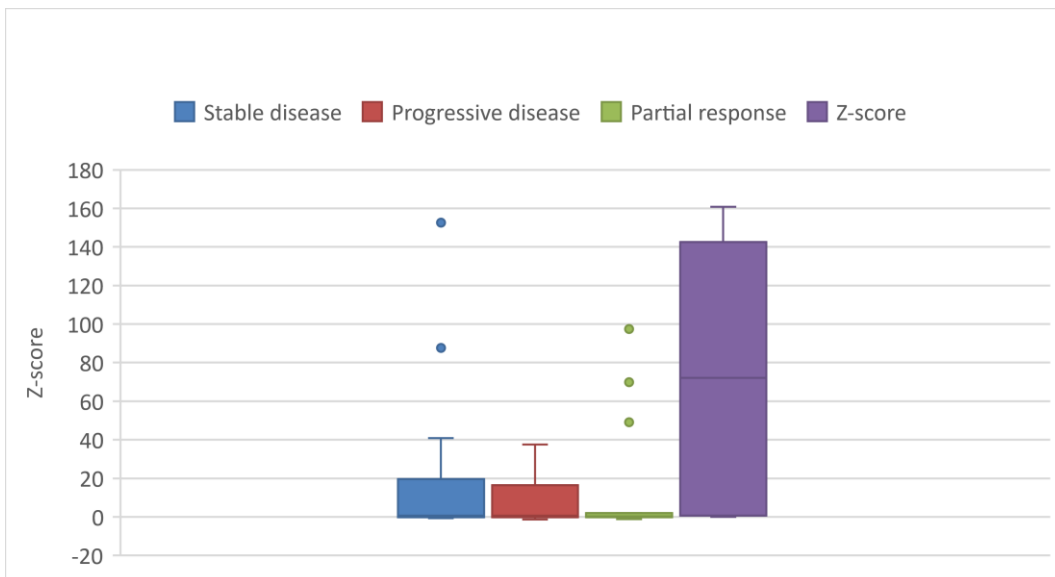
Im Rahmen einer weiteren Studie, die am Institut für Humangenetik mit demselben Patientenkollektiv durchgeführt wurde, bei der prädiktive Wert von sich verändernde ctDNA Levels für eine ICI-Therapie untersucht wird, wurden Mutationen in Krebsgenen detektiert. Da der genomweite z-Score die ctDNA widerspiegelt, wurden die mittleren varianten Allelfrequenzen (VAF) der nachgewiesenen Mutationen mit den z-Scores korreliert. Aufgrund der geringeren Detektionslimit von mFAST-Seq wurden nur z-Scores über 3 herangezogen. Dabei könnte eine nur schwache Korrelation ( $r=0,479$ ) beobachtet werden (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Korrelation zwischen VAF und Z-Score.**

Bei den Patienten mit NSCLC, die mit Immuntherapie behandelt wurden, wurde nur geringe Korrelation zwischen genomweiten Z-score und VAF der nachgewiesenen Mutationen beobachtet.

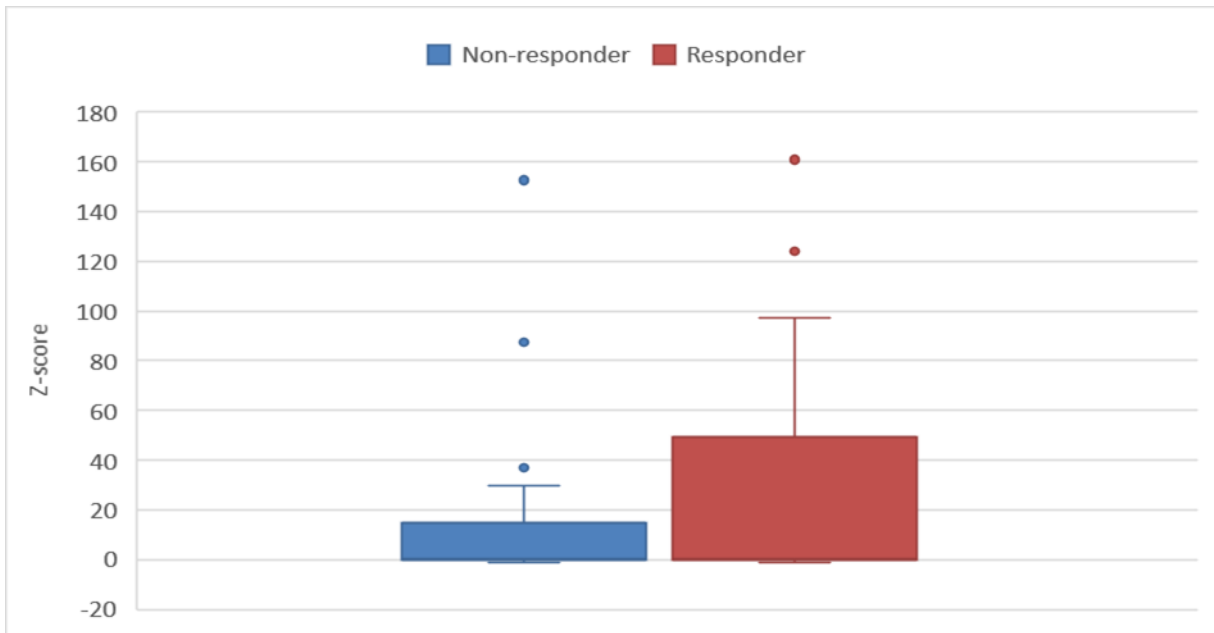
Zudem wurde untersucht ob es eine Korrelation zwischen Z-score und dem Ansprechen an die Immuntherapie gibt.



**Abbildung 9: Korrelation zwischen Z-Score und dem Ansprechen auf Immuntherapie.**

Patienten wurden nach Ansprechen auf die Immuntherapie stratifiziert; vollständiges Ansprechen (eng. complete response), partiales Ansprechen (eng. partial response), stabile Krankheit (stable disease) und fortschreitende Krankheit (eng. progressive disease). Patienten, die an Immuntherapie vollständig angesprochen haben, haben höchste Z-Scores.

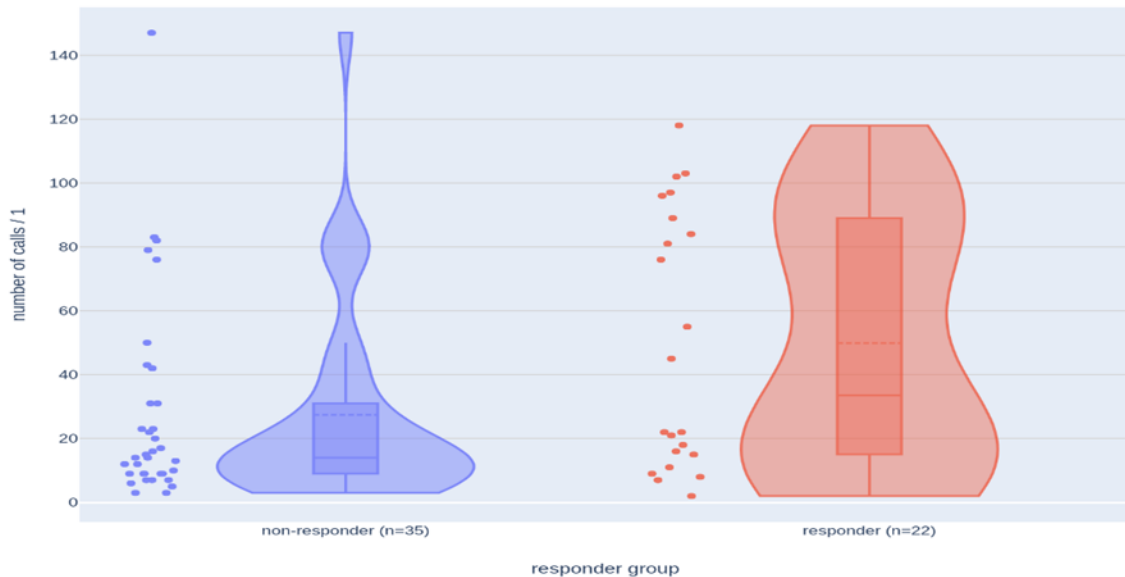
Wie bereits erwähnt, hatten Patienten, die auf die Immuntherapie angesprochen haben, höhere z-Scores als jene die nicht angesprochen haben (**Abbildung 9**, **Abbildung 10**). Eine statistische Auswertung war aufgrund der zu geringen Fallzahl jedoch nicht möglich.



**Abbildung 10: Korrelation zwischen Z-Score und dem Ansprechen auf Immuntherapie.** Die Responder (partielles und vollständiges Ansprechen) hatten offenbar initial ein höheres Tumorgehalt als nicht-Responder (stabile und fortschreitenden Krankheit).

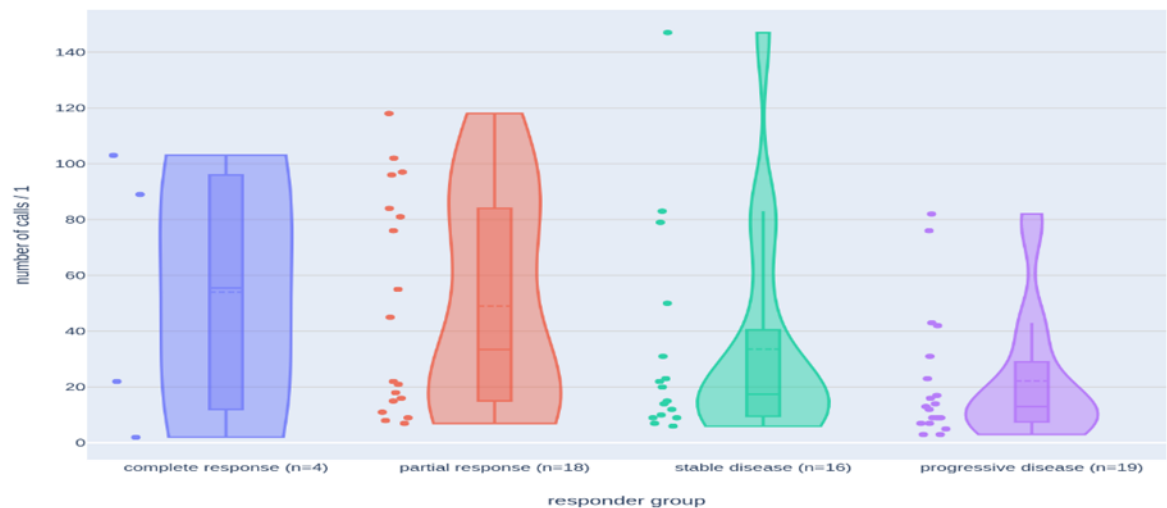
Da laut mehreren Studien TMB als prädiktiver Marker für Immuntherapie, angewandt werden kann, wurde in einem nächsten Schritt getestet ob die Mutations-Last in den *LINE-1* Sequenzen mit dem Ansprechen auf die Behandlung in unserer Kohorte zusammenhängt. Tatsächlich wurde bei Patienten, die auf die Immuntherapie angesprochen haben, eine höhere Anzahl an Mutation nachgewiesen als diejenigen, die kein Ansprechen zeigten (**Abbildung 11**, **Abbildung 12**). Insgesamt wurden 4065 Varianten bei Patienten, die auf die Immuntherapie angesprochen haben, detektiert (davon 940 bei Patienten, die auf die Therapie vollständig angesprochen haben und 3125 bei denen nur ein partielles Ansprechen zu beobachten war. Im Gegensatz dazu wurden bei den Patienten, die nicht auf die Therapie angesprochen haben nur 1787

Mutationen davon 948 bei Patienten mit stabiler und 839 bei Patienten mit fortschreitender Krankheit



**Abbildung 11: Violin-Plot von Anzahl an Mutationen in LINE-Sequenzen im Plasma-DNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten.**

Patienten wurden nach Ansprechen auf die Immuntherapie stratifiziert; nicht-Responder - blau (stabile und fortschreitenden Krankheit) und Responder - rot (partiell und vollständiges Ansprechen).



**Abbildung 12: Violin-Plot von Anzahl an Mutationen in LINE-Sequenzen im Plasma-DNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten.**

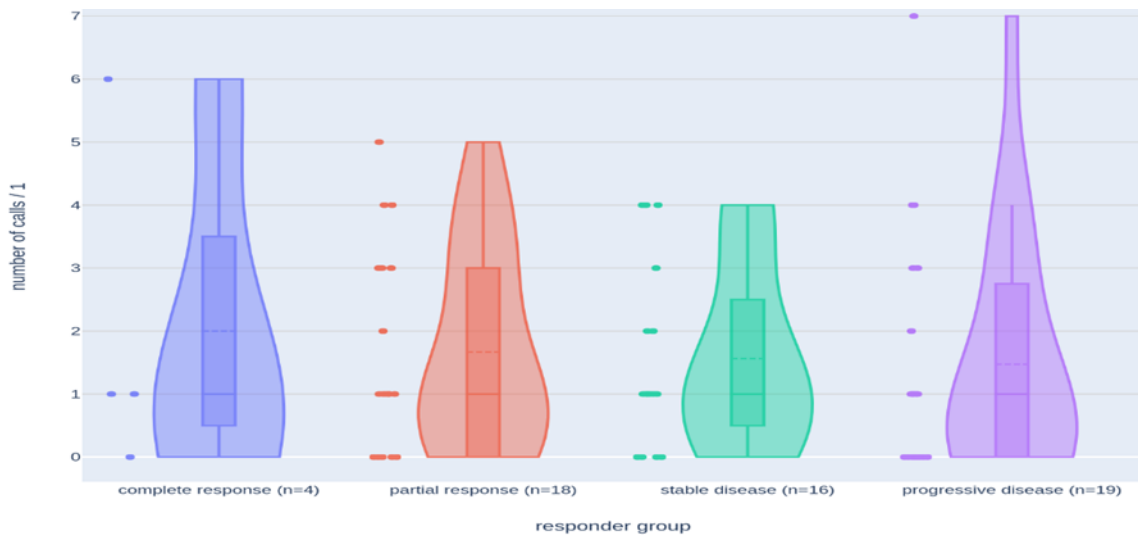
Patienten wurden nach Ansprechen auf die Immuntherapie stratifiziert; vollständiges Ansprechen - blau (eng. complete response), partielles Ansprechen - rot (eng. partial response), stabile Krankheit - grün (stable disease) und fortschreitende Krankheit - violett (eng. progressive disease).

Im Gegensatz dazu zeigte die Anzahl von Indels (Insertionen und Deletionen) in homopolymeren Regionen, die eine MSI widerspiegeln könnten, kein Unterschied zwischen Responder und nicht-Responder (**Abbildung 13, Abbildung 14**).



**Abbildung 13: Violin-Plot von Indels in Homopolymerregionen in LINE-Sequenzen in pDNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten.**

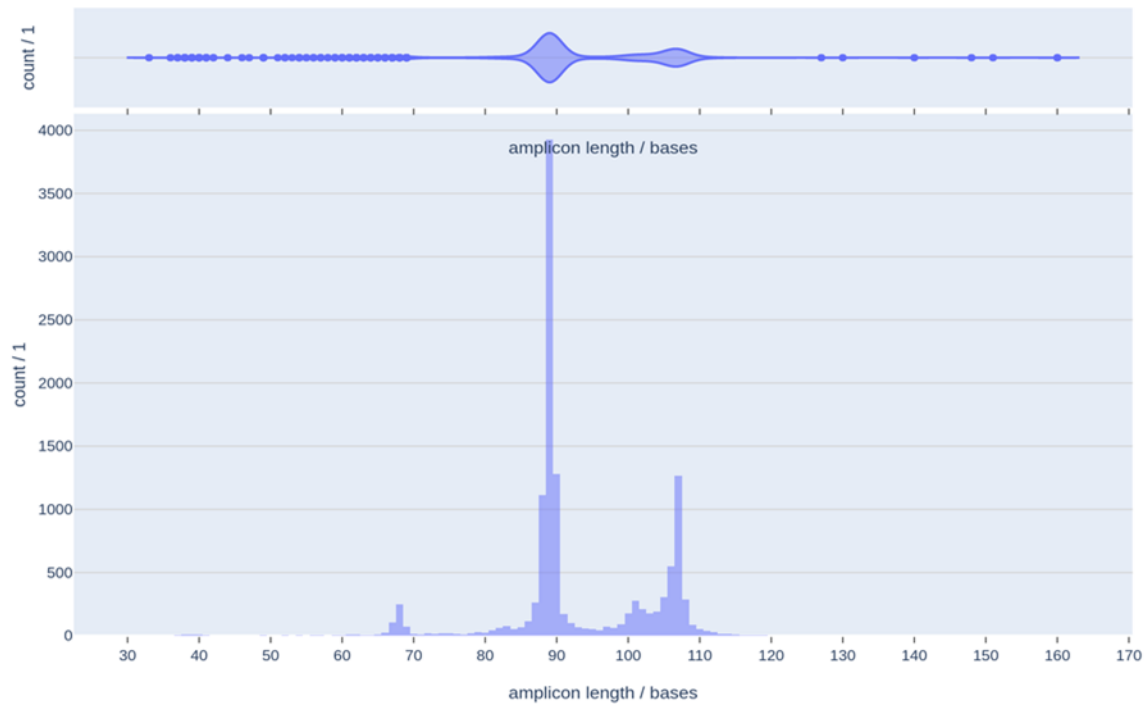
Patienten wurden nach Ansprechen auf die Immuntherapie stratifiziert; nicht-Responder - blau (stabile und fortschreitenden Krankheit) und Responder -rot (partielles und vollständiges Ansprechen).



**Abbildung 14: Violin-Plot von Indels in Homopolymerregionen in LINE-Sequenzen in pDNA von mit Immuntherapie behandelten Patienten.**

Patienten wurden nach Ansprechen auf die Immuntherapie stratifiziert; vollständiges Ansprechen - blau (eng. complete response), partielles Ansprechen - rot (eng. partial response), stabile Krankheit -grün (stable disease) und fortschreitende Krankheit - violett (eng. progressive disease).

*Douville et al.* (88) berichteten über einem Amplifikations-Bias geschrieben. Um zu überprüfen ob auch in den vorliegenden Daten das gleiche Bias vertreten ist wurde untersucht ob kurze Amplifon überrepräsentiert sind. Wie in der **Abbildung 15** ersichtlich, ist es nicht der Fall und die Amplikons sind am häufigsten 88 bp lang.



**Abbildung 15: Amplicon Länge gemessen zwischen den inneren Primerenden (exklusive 35 Primerbasen).**

Es sind 4 Moden sichtbar: 68 bp, 88 bp, 102 bp, 107 bp. Amplikons sind am häufigsten 88 bp lang (bzw. breit). Oben: Violin-Plot der Amplicon-Größenverteilung. Ausreißer zu beiden Enden der Skala hin sind im Violin-Plot erkennbar.

## 5. Diskussion

NSCLC ist die häufigste krebsbedingte Todesursache weltweit. Da sich die meisten Patienten aufgrund der oftmals späten Diagnose in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit befinden, wird fast allen Patienten die Chemotherapie als ersten Therapieschritt empfohlen. Leider reagieren die Tumorzellen nicht immer wie gewünscht und wachsen nach der Therapie noch aggressiver als zuvor. In letzter Zeit berichteten aber viele Forschungsgruppen über der Immuntherapie und Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), die, laut Studienergebnissen, die zukünftigen Behandlungsoptionen für Krebspatienten mit fortgeschrittenem Krebs revolutionieren könnten (50). Jedoch spricht, aus noch immer unbekanntem Gründen, nur ein kleiner Teil der Patienten auf diese Therapie an (zwischen 20% und 25 %) (2, 3). Daher ist es unbedingt erforderlich, Biomarker zu identifizieren, die das Ansprechen eines Tumors auf Immuntherapie vorhersagen können (91). Die Suche nach potenziellen Biomarkern hat bisher einige potenzielle Kandidaten, wie zum Beispiel PD1/PD-L1 Expression, TMB oder MSI ergeben, allerdings wird keiner dieser Marker routinemäßig verwendet. Da der Lungenkrebs nicht zu der Gruppe von mikrosatelliteninstabilen Tumoren gehört, wird eher TMB in der Literatur als prädiktiver Marker für die Immuntherapie vorgeschlagen (28). Allerdings ist die Bestimmung von TMB eines Tumors relativ zeit- und kostenintensiv, da mindestens eine Megabase sequenziert werden muss. Ein weiteres Problem stellt auch das Fehlen von klar definiertem Grenzbereich für hohe bzw. niedrige TMB-Wert dar, da der TMB bisher mit verschiedensten Genpanels und Testplattformen ermittelt wurde. Daher sind die Harmonisierung der TMB-Messmethodik über Plattformen hinweg und die Feststellung der Schwellenwerte notwendige Schritte zur Implementierung von TMB als prädiktiven Marker in der Klinik (92).

Um überhaupt die zielgerichteten Therapien anwenden zu können, muss das molekulare Profil des Tumors bekannt sein. Es kann entweder aus dem Tumor selbst (Gewebe-Biopsie) aber auch mittels einer nicht-invasiven Liquid Biopsy bestimmt werden. Die Liquid Biopsy ist eine Methode, bei der die genetische Zusammensetzung des Tumors anhand einer Biofluidprobe (Blut, Urin, Aszites oder Pleuraergüssen) beurteilt werden kann (59, 60). Da die Entnahme dieser Flüssigkeiten jederzeit

wiederholbar ist, ist eine Tumor-Überwachung und Früherkennung von Rezidiven und Resistenzen möglich. Mittels dieser Methode kann man die verschiedenste, zirkulierende vom Tumor stammenden Komponenten wie CTCs, ctDNA, zirkulierende freie RNA etc. gewinnen (1, 60, 76, 87, 93).

Am Institut für Humangenetik wird die Anwendung der Liquid Biopsy, im Speziellen ctDNA, seit Jahren beforscht. Dabei wird ein breites Spektrum an Analysemethoden angewandt (1, 60, 70, 76, 87, 93). In weiterem Schritt wird zumeist die mFAST-SeqS Methode zur Stratifikation von Patienten anhand ihres Tumorgehalt angewandt. Mittels mFAST-SeqS wird das genomweite z-Score bestimmt, der eine Abschätzung des Tumorgehalts basierend auf Kopienzahlveränderungen erlaubt (94). Die originale FAST-SeqS wurde vor kurzem von den Forschern, die die Methode entwickelt haben, weiterentwickelt. Laut den Autoren ermöglicht der neue Algorithmus (WALDO) durch die Verwendung von molekularen Barcodes in Kombination mit korrespondierender, konstitutioneller DNA die Erkennung von tumorspezifischen *LINE-1* Mutationen. Damit könnte man auch karzinogenen Signaturen oder MSI erkennen (88). Daten diesbezüglich wurden von den Autoren allerdings nicht präsentiert. Daher sollte es im Rahmen die Anwendbarkeit von WALDO für klinische Fragestellungen untersucht werden.

Um die WALDO-Methode zu etablieren wurde vorerst die optimale DNA-Inputmenge mittels hochqualitativer genomischer DNA der Firma Promega für die Library Preparation ermittelt. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Menge an Input-DNA (0,5ng, 1,0ng und 1,5ng) eingesetzt. Gleichzeitig wurden auch die beiden Primerpaare mit dualen 6bp. bzw 12bp langen UMIs getestet. Alle Kombinationen führten zu den erwarteten PCR-Produkten, wobei die Library Preparation mit 1,5ng in Kombination mit 12 UMI Primer die höchste Produkt-Molarität lieferte. Nach der wiederholten Testung des Protokolls mit klinischen Proben und anschließender Sequenzierung hat die erste Datenanalyse jedoch gezeigt, dass eine bessere UMI Verteilung mit den dualen 6 bp-UMI-Primer erzielt wird (**Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4**). Da aber die Anzahl an gewonnen Reads mit 12 bp-UMI Primer höher war, wurde es entschieden, dass

man im Weiteren mit 12 bp-UMI und einer Mindestinputmenge von 1,5ng für die Library Preparation arbeitet.

Im WALDO Paper wurde ein möglicher Amplifikationsbias erwähnt hinsichtlich der Überrepräsentierung kurzer Amplikons verglichen mit Längeren. Unsere Daten zeigten dieses Bias, das die Ergebnisse maßgeblich beeinträchtigen würde, nicht. Die durchschnittliche Länge der gewonnenen Amplikons betrug 88 bp. Dies liegt offenbar an dahinterstehender bioinformatischer Pipeline. Für die Erstellung dieser Pipeline als auch die weiteren bioinformatischen Auswertungen war unser Bioinformatiker zuständig, daher würde eine weitere Aufklärung der bioinformatische Hintergrund über die Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

Anhand von drei klinischen Proben von Patienten mit Prostatakarzinom wurde die WALDO-Methode mit dem mFAST-SeqS Algorithmus hinsichtlich der Aneuploidiedetektion verglichen. Dabei wiesen die genomweiten z-Scores eine gute Übereinstimmung auf. Da aber die Stichprobe zu klein war kann man keine gerechtfertigte Aussage darüber treffen, ob eine von diesen Methoden sensitiver ist; dafür müsste der Probenumfang viel größer sein. Nichtsdestotrotz könnte WALDO zu dem Zweck der Aneuploidiedetektion die ursprüngliche mFAST-SeqS ersetzen und wie mFAST-SeqS als kostengünstiges und rasches Pre-screening-Tool zur Stratifikation den Proben anhand von Tumorgehalt angewandt werden.

Obwohl WALDO was die Detektion von Kopienzahlveränderungen betrifft eine viel geringere Auflösung als plasma-Seq hat, konnte eine gute Übereinstimmung der Kopienzahlen beobachtet werden. Alle Kopienzahlveränderungen, die an plasma-Seq Profilen zu sehen sind, sind auch an den WALDO-Profilen anschaulich, was anzeigt, dass WALDO zusätzlich die Einblicke in Kopienzahländerungen auf der Chromosomenarmebene geben kann.

Intratumorale Heterogenität stellt eine der größten Herausforderungen für die korrekte Diagnose und anschließende Therapie-Entscheidung dar (54, 55). Als Index für die Heterogenität wird die Varianten-Allelfrequenz (VAF) verwendet, die als der Anteil von Reads mit Mutationen an der varianten Stelle definiert ist und somit den Tumorgehalt widerspiegelt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es eine mittlere Korrelation zwischen

den genomweiten z-Scores und VAF gibt. Da es sich um orthogonale Ansätze zur Bestimmung des Tumorgehaltes handelt, die unterschiedliche Parameter heranziehen, waren auch einige Ausreißer zu erwarten. Beispielsweise zeichnet sich eine Probe durch eine hohe z-Score aber eine niedrige VAF aus. In diesem Fall ist es möglich, dass die Probe eine hochfrequente Mutation in einem Gen hat, der mit dem Gen-Panel nicht erfasst wurde und daher konnte die Mutation auch nicht detektiert werden. Deswegen ist es wichtig zu beachten, dass die Tumorgehalt abhängig von dem verwendeten Gen-Panel variieren kann.

In vorangegangenen Studien des Instituts für Humangenetik konnte gezeigt werden, dass erhöhte z-Score und somit ein höheres Maß an Aneuploidie bzw. ein hoher Tumorgehalt mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (95–97). Interessanterweise, hatten in dieser Studie Patienten, die auf die Immuntherapie besser angesprochen haben, höhere z-Scores im Vergleich zu denen die nicht angesprochen haben. Allerdings könnte dies darauf hinweisen, dass die Patienten, die einen sehr aktiven Tumor haben und daher mehr ctDNA freisetzen, besser auf ICI ansprechen.

Laut der aktuellen Literatur ist der TMB ein vielversprechender prädikativer Marker für Immuntherapie. Da die TMB-Bestimmung zeit- und kostenintensiv ist, haben wir uns in dieser Arbeit mit der Suche nach einen Surrogat-Marker für TMB beschäftigt. Da laut den Entwicklern die WALDO-Methode unter anderem für die Erkennung von tumorspezifischen *LINE-1* Mutationen angewandt werden kann, wurde in Rahmen dieser Arbeit untersucht ob Anzahl der Mutationen in *LINE-1*-Sequenzen als Surrogatmarker für TMB, bzw. für das Ansprechen an Immuntherapie verwendet werden kann. Unsere präliminären Ergebnisse zeigen, dass die Mutationslast in *LINE-1*-Sequenzen mit dem Ansprechen korreliert, da bei Patienten, die auf die Immuntherapie ansprechen (vollständig oder partiell) mehr Mutationen detektiert werden konnten. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass die Anzahl an Mutationen in *LINE-1*-Sequenzen als potenzieller Surrogatmarker für TMB und somit auch als prädiktive Marker für Immuntherapie verwendet werden kann. Jedenfalls müsste man diese Ergebnisse aber in einem größeren Kollektiv validieren.

Zudem wäre die Bestimmung von TMB einer viel größeren Stichprobe mittels WES (Whole-Exom-Sequenzierung) oder zumindest Sequenzierung einer Megabase und anschließender Vergleich mit der Anzahl an Mutationen in LINE-1-Sequenzen von diesen Proben erforderlich. Erst dann könnte man eine signifikante Aussage treffen.

Eine Korrelation zwischen der Anzahl an Mutationen (Insertionen und Deletionen) in homopolymeren Regionen und dem Ansprechen war nicht gegeben. Da der Lungenkrebs nicht zu den mikrosatelliteninstabilen Tumoren gehört, war dies auch nicht zu erwarten. Jedenfalls, um die Anwendung von WALDO für die Erkennung von MSI zu testen, müsste man mit Proben arbeiten, die durch die Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet sind.

## 5.1. Conclusio

Die biomedizinische Forschung hat in letzter Zeit enorme Fortschritte gemacht, wenn es um die Therapie von NSCLC geht. Die seit einigen Jahren eingeführte Immuntherapie stellt die größte Hoffnung für NSCLC-Patienten dar. Obwohl die Nebenwirkungen zwar durch Autoimmuneffekte auftreten können, sind sie im Verhältnis zu Nebenwirkungen der bisherigen Chemotherapien selten und meistens auch gut behandelbar. Jedoch ist die Ansprechrate nach wie vor sehr gering. Deswegen beschäftigt sich die immunologische Forschung stark mit der Suche nach prädiktiven Markern für die Immuntherapie. Bisher zeigten TMB und MSI ein starkes Potenzial. Die Bestimmung von TMB ist allerdings sehr kosten- und zeitintensiv. In dieser Arbeit wurde es versucht, einen potenziellen Surrogatmarker für TMB zu finden. Zu diesem Zweck wurde die kürzlich veröffentlichte WALDO-Methode getestet.

Die Stratifikation der Patienten anhand ihres Tumorgehaltes in Plasma wird am Institut für Humangenetik anhand der mFAST-SeqS Methode routinemäßig durchgeführt, die auf der selektiven Amplifikation von *LINE-1* Sequenzen beruht. Die WALDO Methode stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglichen FAST-SeqS Methode dar. Der neue Algorithmus ermöglicht nicht nur die Stratifikation von Patienten, sondern auch die Bestimmung der Mutationlast in *LINE-1* Sequenzen sowie die Bestimmung von MSI. Die neue WALDO Methode unterscheidet sich hinsichtlich der Aneuploidiedetektion nicht von der ursprünglichen mFAST-SeqS Methode. Jedoch liefert sie eine größere

Menge an Informationen. Die präliminären Daten dieser Studie bestätigten die Null-Hypothese und zeigten, dass die mittels WALDO bestimmte Anzahl an Mutationen in *LINE-1*-Sequenzen mit dem Ansprechen auf Immuntherapie korreliert und somit als Surrogatmarker für TMB verwendet werden könnte. Nichtsdestotrotz ist es zu erwähnen, dass die Stichprobe sicherlich viel zu klein war, um verlässliche Aussagen abzuleiten. Es sind daher weitere Studien mit einem größeren Umfang erforderlich um die Mutationlast in *LINE-1*-Sequenzen als Surrogat für TMB zu validieren.

Diese Studie war nicht geeignet für die Testung der Anwendbarkeit von WALDO für die Bestimmung von MSI. Dafür sind weitere Studien aber mit mikrosatelliteninstabilen Proben nötig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass WALDO eine günstige und schnelle Methode für die Stratifikation von Patienten darstellt. Weiterhin ermöglicht diese Methode auch die Bestimmung von Mutationslast in *LINE-1*-Sequenzen, der ein potenzieller Surrogatmarker für TMB ist.

## Literatur

1. Heitzer E. Ein vielversprechendes Werkzeug. *Wien klin Mag* 2016; 19(2):36–43. doi: 10.1007/s00740-016-0099-0.
2. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373(17):1627–39. doi: 10.1056/NEJMoa1507643.
3. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(21):2018–28. doi: 10.1056/NEJMoa1501824.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
5. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 2011; 32(4):605–44. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001.
6. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017; 67(2):93–9. doi: 10.3322/caac.21388.
7. Kovalchik SA, Tammemagi M, Berg CD, Caporaso NE, Riley TL, Korch M et al. Targeting of low-dose CT screening according to the risk of lung-cancer death. *N Engl J Med* 2013; 369(3):245–54. doi: 10.1056/NEJMoa1301851.
8. Haranguş A, Berindan-Neagoe I, Todea DA, Şimon I, Şimon M. Noncoding RNAs and Liquid Biopsy in Lung Cancer: A Literature Review. *Diagnostics (Basel)* 2019; 9(4). doi: 10.3390/diagnostics9040216.
9. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143(5 Suppl):e142S-e165S. doi: 10.1378/chest.12-2353.

10. van Beek E, JR, Mirsadraee S, Murchison JT. Lung cancer screening: Computed tomography or chest radiographs? *World J Radiol* 2015; 7(8):189–93. doi: 10.4329/wjr.v7.i8.189.
11. What imaging tests are useful in diagnosing lung cancer? [Stand: 19.12.2019]. Verfügbar unter: <https://www.webmd.com/lung-cancer/qa/what-imaging-tests-are-useful-in-diagnosing-lung-cancer>.
12. Sharma P, Singh H, Basu S, Kumar R. Positron emission tomography-computed tomography in the management of lung cancer: An update. *South Asian J Cancer* 2013; 2(3):171–8. doi: 10.4103/2278-330X.114148.
13. Ambrosini V, Nicolini S, Caroli P, Nanni C, Massaro A, Marzola MC et al. PET/CT imaging in different types of lung cancer: an overview. *Eur J Radiol* 2012; 81(5):988–1001. doi: 10.1016/j.ejrad.2011.03.020.
14. Inage T, Nakajima T, Yoshino I, Yasufuku K. Early Lung Cancer Detection. *Clin Chest Med* 2018; 39(1):45–55. doi: 10.1016/j.ccm.2017.10.003.
15. Gupta C, Su J, Zhan M, Stass SA, Jiang F. Sputum long non-coding RNA biomarkers for diagnosis of lung cancer. *Cancer Biomarkers* 2019; 26(2):219–27. Verfügbar unter: <https://content.iospress.com:443/download/cancer-biomarkers/cbm190161?id=cancer-biomarkers%2Fcbm190161>.
16. Xing L, Su J, Guarnera MA, Zhang H, Cai L, Zhou R et al. Sputum microRNA biomarkers for identifying lung cancer in indeterminate solitary pulmonary nodules. *Clin Cancer Res* 2015; 21(2):484–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1873.
17. Su Y, Fang H, Jiang F. Integrating DNA methylation and microRNA biomarkers in sputum for lung cancer detection. *Clin Epigenetics* 2016; 8:109. doi: 10.1186/s13148-016-0275-5.
18. Bronchoscopy: Learn the Procedure's Risks and Complications [Stand: 06.01.2020]. Verfügbar unter: [https://www.medicinenet.com/bronchoscopy/article.htm#what\\_is\\_bronchoscopy](https://www.medicinenet.com/bronchoscopy/article.htm#what_is_bronchoscopy).

19. Bronchoskopie [Stand: 06.01.2020]. Verfügbar unter:  
<https://flexikon.doccheck.com/de/Bronchoskopie>.
20. Annema JT, van Meerbeeck JP, Rintoul RC, Doooms C, Deschepper E, Dekkers OM et al. Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2010; 304(20):2245–52. doi:  
10.1001/jama.2010.1705.
21. Detterbeck FC, Jantz MA, Wallace M, Vansteenkiste J, Silvestri GA. Invasive mediastinal staging of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132(3 Suppl):202S-220S. doi:  
10.1378/chest.07-1362.
22. Yao X, Gomes MM, Tsao MS, Allen CJ, Geddie W, Sekhon H. Fine-needle aspiration biopsy versus core-needle biopsy in diagnosing lung cancer: a systematic review. *Curr Oncol* 2012; 19(1):e16-27. doi: 10.3747/co.19.871.
23. Wallace MJ, Krishnamurthy S, Broemeling LD, Gupta S, Ahrar K, Morello FA et al. CT-guided percutaneous fine-needle aspiration biopsy of small (< or =1-cm) pulmonary lesions. *Radiology* 2002; 225(3):823–8. doi:  
10.1148/radiol.2253011465.
24. Milman N. Percutaneous lung biopsy with a fine bore cutting needle (Vacu-Cut): improved results using drill technique. *Thorax* 1995; 50(5):560–2. doi:  
10.1136/thx.50.5.560.
25. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28(suppl\_4):iv1-iv21. doi: 10.1093/annonc/mdx222.
26. CancerCare. Lung Cancer 101: CancerCare®; 2020 [Stand: 20.01.2020]. Verfügbar unter: [https://www.lungcancer.org/find\\_information/publications/163-lung\\_cancer\\_101/269-non\\_small\\_cell\\_lung\\_cancer\\_treatment](https://www.lungcancer.org/find_information/publications/163-lung_cancer_101/269-non_small_cell_lung_cancer_treatment).
27. Scagliotti GV, Parikh P, Pawel J von, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus

- pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(21):3543–51. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0375.
28. Shah DR, Masters GA. Precision Medicine in Lung Cancer Treatment. *Surg Oncol Clin N Am* 2020; 29(1):15–21. doi: 10.1016/j.soc.2019.08.002.
  29. Früh M, Ruyscher D de, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6:vi99-105. doi: 10.1093/annonc/mdt178.
  30. Jones GS, Elimian K, Baldwin DR, Hubbard RB, McKeever TM. A systematic review of survival following anti-cancer treatment for small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2020; 141:44–55. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.12.015.
  31. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014:150845. doi: 10.1155/2014/150845.
  32. Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 2000; 60 Suppl 1:15-23; discussion 41-2. doi: 10.2165/00003495-200060001-00002.
  33. Silvestri GA, Rivera MP. Targeted therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a review of the epidermal growth factor receptor antagonists. *Chest* 2005; 128(6):3975–84. doi: 10.1378/chest.128.6.3975.
  34. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1995; 19(3):183–232. doi: 10.1016/1040-8428(94)00144-i.
  35. Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Kelly PJ, Harris AL. The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br J Cancer* 1993; 68(1):162–5. doi: 10.1038/bjc.1993.306.
  36. Arteaga C. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* 2003; 30(3 Suppl 7):3–14.

37. Ke X, Shen L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Frontiers in Laboratory Medicine* 2017; 1(2):69–75. doi: 10.1016/j.flm.2017.06.001.
38. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(1):3–9. doi: 10.1677/erc.0.0080003.
39. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018; 553(7689):446–54. doi: 10.1038/nature25183.
40. Cho JH, Lim SH, An HJ, Kim KH, Park KU, Kang EJ et al. Osimertinib for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Multicenter, Open-Label, Phase II Trial (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol* 2019;JCO1900931. doi: 10.1200/JCO.19.00931.
41. Guo Y, Cao R, Zhang X, Huang L, Sun L, Zhao J et al. Recent Progress in Rare Oncogenic Drivers and Targeted Therapy For Non-Small Cell Lung Cancer. *Onco Targets Ther* 2019; 12:10343–60. doi: 10.2147/OTT.S230309.
42. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 1995; 81(1):95–105. doi: 10.1016/0092-8674(95)90374-7.
43. Goldenson B, Crispino JD. The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene* 2015; 34(5):537–45. doi: 10.1038/onc.2014.14.
44. Lehman JM, Gwin ME, Massion PP. Immunotherapy and Targeted Therapy for Small Cell Lung Cancer: There Is Hope. *Curr Oncol Rep* 2017; 19(7):49. doi: 10.1007/s11912-017-0609-2.
45. Jung CY, Antonia SJ. Tumor Immunology and Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2018; 81(1):29–41. doi: 10.4046/trd.2017.0120.
46. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39(1):1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.

47. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017; 541(7637):321–30. doi: 10.1038/nature21349.
48. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008; 224:166–82. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x.
49. Kim HC, Choi CM. Current Status of Immunotherapy for Lung Cancer and Future Perspectives. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2020; 83(1):14–9. doi: 10.4046/trd.2019.0039.
50. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* 2016; 39(1):98–106. doi: 10.1097/COC.000000000000239.
51. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480(7378):480–9. doi: 10.1038/nature10673.
52. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515(7528):563–7. doi: 10.1038/nature14011.
53. Shah DR, Masters GA. Precision Medicine in Lung Cancer Treatment. *Surg Oncol Clin N Am* 2020; 29(1):15–21. doi: 10.1016/j.soc.2019.08.002.
54. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10):883–92. doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
55. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 2013; 501(7467):355–64. doi: 10.1038/nature12627.
56. Ilić M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(4):420–3. doi: 10.21037/tlcr.2016.08.06.
57. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring [Stand: 07.01.2020]. Verfügbar unter: <http://tcr.amegroups.com/article/view/4546>.

58. Liquid Biopsy: Status 2016. Deutsches Ärzteblatt 39/2016 2016. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/treffer?mode=s&wo=1008&typ=256&aid=182536&autor=Dahl%2C+Edgar>.
59. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(9):531–48. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.14.
60. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019; 20(2):71–88. doi: 10.1038/s41576-018-0071-5.
61. Pérez-Callejo D, Romero A, Provencio M, Torrente M. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(5):455–65. doi: 10.21037/tlcr.2016.10.07.
62. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G et al. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846(2):539–46. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.10.001.
63. MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142(3-4):241–3.
64. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3):646–50.
65. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(1):67–71.
66. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86(4):774–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x.
67. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* 2016; 7(30):48832–41. doi: 10.18632/oncotarget.9453.

68. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014; 20(5):548–54. doi: 10.1038/nm.3519.
69. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14(9):985–90. doi: 10.1038/nm.1789.
70. Kashofer K, Popper H, Brcic L, Balic M, Heitzer E, Höfler G. Neue Diagnostik für das Lungenkarzinom. *Wien klin Mag* 2018; 21(4):166–71. doi: 10.1007/s00740-018-0240-3.
71. Jung A, Kirchner T. Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis. *Dtsch Arztebl Int* 2018; 115(10):169–74. doi: 10.3238/arztebl.2018.0169.
72. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998; 17(1):89–97. doi: 10.1097/00006676-199807000-00012.
73. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4):1659–65.
74. Jiang P, Lo YMD. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet* 2016; 32(6):360–71. doi: 10.1016/j.tig.2016.03.009.
75. Xu-Welliver M, Carbone DP. Blood-based biomarkers in lung cancer: prognosis and treatment decisions. *Transl Lung Cancer Res* 2017; 6(6):708–12. doi: 10.21037/tlcr.2017.09.08.
76. Ulz P, Geigl JB, Speicher MR, Heitzer E. Neueste technologische Entwicklungen für die Analyse von zirkulierender Tumor-DNA. *medgen* 2016; 28(2):234–44. doi: 10.1007/s11825-016-0089-z.

77. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet* 2001; Chapter 9:Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142905.hg0908s07.
78. Saxena D, Sheikh S, Kao G, Binder ZA, Alonso-Basanta M, O'Rourke DM et al. Rapid and ultrasensitive digital PCR (dPCR) profiling of EGFRvIII in tumor cells and tissues. *Neurooncol Adv* 2019; 1(1):vdz030. doi: 10.1093/oaajnl/vdz030.
79. García-Foncillas J, Alba E, Aranda E, Díaz-Rubio E, López-López R, Tabernero J et al. Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. *Ann Oncol* 2017; 28(12):2943–9. doi: 10.1093/annonc/mdx501.
80. Barbano R, Pasculli B, Coco M, Fontana A, Copetti M, Rendina M et al. Competitive allele-specific TaqMan PCR (Cast-PCR) is a sensitive, specific and fast method for BRAF V600 mutation detection in Melanoma patients. *Sci Rep* 2015; 5:18592. doi: 10.1038/srep18592.
81. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012; 4(136):136ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3003726.
82. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O'Connell A, Mach SL et al. Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22(4):915–22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1627-T.
83. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 2016; 34(5):547–55. doi: 10.1038/nbt.3520.
84. Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res* 2017; 27(3):491–9. doi: 10.1101/gr.209601.116.

85. Kinde I, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. FAST-SeqS: a simple and efficient method for the detection of aneuploidy by massively parallel sequencing. *PLoS ONE* 2012; 7(7):e41162. doi: 10.1371/journal.pone.0041162.
86. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463(7283):899–905. doi: 10.1038/nature08822.
87. Belic J, Koch M, Ulz P, Auer M, Gerhalter T, Mohan S et al. mFast-SeqS as a Monitoring and Pre-screening Tool for Tumor-Specific Aneuploidy in Plasma DNA. *Adv Exp Med Biol* 2016; 924:147–55. doi: 10.1007/978-3-319-42044-8\_28.
88. Douville C, Springer S, Kinde I, Cohen JD, Hruban RH, Lennon AM et al. Detection of aneuploidy in patients with cancer through amplification of long interspersed nucleotide elements (LINEs). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(8):1871–6. doi: 10.1073/pnas.1717846115.
89. Qiagen. Gentra® Puregene® Handbook: DNA Purification from Buffy Coat Using the Gentra Puregene Blood Kit; 2014.
90. Technologies A. Agilent DNA 7500 and DNA 12000 Kit Guide 2016.
91. Internetredaktion RBL. Immuntherapie – kann das Immunsystem Krebs bekämpfen? - DLR Gesundheitsforschung; 2017 [Stand: 04.02.2020]. Verfügbar unter: <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/immuntherapie-kann-das-immunsystem-krebs-bekampfen-7033.php>.
92. Steuer CE, Ramalingam SS. Tumor Mutation Burden: Leading Immunotherapy to the Era of Precision Medicine? *J Clin Oncol* 2018; 36(7):631–2. doi: 10.1200/JCO.2017.76.8770.
93. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61(1):112–23. doi: 10.1373/clinchem.2014.222679.
94. Suppan C, Brcic I, Tiran V, Mueller HD, Posch F, Auer M et al. Untargeted Assessment of Tumor Fractions in Plasma for Monitoring and Prognostication from Metastatic Breast Cancer Patients Undergoing Systemic Treatment. *Cancers (Basel)* 2019; 11(8). doi: 10.3390/cancers11081171.

95. Belic J, Graf R, Bauernhofer T, Cherkas Y, Ulz P, Waldispuehl-Geigl J et al. Genomic alterations in plasma DNA from patients with metastasized prostate cancer receiving abiraterone or enzalutamide. *Int J Cancer* 2018; 143(5):1236–48. doi: 10.1002/ijc.31397.
96. Wit S de, Rossi E, Weber S, Tamminga M, Manicone M, Swennenhuis JF et al. Single tube liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2019; 144(12):3127–37. doi: 10.1002/ijc.32056.
97. Suppan C, Brcic I, Tiran V, Mueller HD, Posch F, Auer M et al. Untargeted Assessment of Tumor Fractions in Plasma for Monitoring and Prognostication from Metastatic Breast Cancer Patients Undergoing Systemic Treatment. *Cancers (Basel)* 2019; 11(8). doi: 10.3390/cancers11081171.